



UNIVERSITA' DI PISA
Corso di Laurea Magistrale in Medicina Veterinaria

***Istotipo come fattore prognostico nelle
neoplasie mammarie della cagna***

Candidato: MICHELETTI Annalena Relatori: Prof. VANNOZZI Iacopo

Prof. POLI Alessandro

ANNO ACCADEMICO 2007-2008

*Ai miei genitori,
ed al mio cane Argo,*

dedico.

RIASSUNTO	Pag 5
INTRODUZIONE	Pag 6
CAPITOLO 1	Pag 7
Anatomia della mammella della cagna	Pag 8
Numero e topografia	Pag 8
Conformazione ed anomalie	Pag 9
Struttura	Pag 10
Evoluzione e controllo ormonale	Pag 14
Irrorazione ed innervazione	Pag 16
CAPITOLO 2	Pag 19
Approccio clinico, diagnostico e terapeutico per le neoplasie mammarie della cagna	Pag 20
Incidenza e fattori di rischio	Pag 20
Stadiazione clinica del tumore: TNM	Pag 23
Approccio diagnostico: linee guida	Pag 24
Chirurgia	Pag 30
Esame istopatologico	Pag 33
Chemioterapia	Pag 34
Terapia ormonale	Pag 35
Radioterapia	Pag 37
Terapia con anti-infiammatori non steroidei	Pag 38
Follow-up	Pag 38
CAPITOLO 3	Pag 40
Classificazione istopatologica delle neoplasie mammarie nei carnivori domestici	Pag 41
Carcinoma non infiltrante in situ	Pag 44
Carcinoma complesso	Pag 45
Carcinoma semplice	Pag 46
Tipi speciali di carcinoma	Pag 48
Sarcoma	Pag 50
Carcinosarcoma	Pag 51
Carcinoma o sarcoma in tumori benigni	Pag 51
Adenoma	Pag 52
Fibroadenoma	Pag 54
Tumore misto benigno	Pag 54
Papilloma duttale	Pag 55
Iperplasia duttale	Pag 55
Iperplasia lobulare	Pag 55
Cisti	Pag 56
Ectasie duttali	Pag 56
Fibrosi focale	Pag 56
Ginecomastia	Pag 56
Carcinoma infiammatorio	Pag 56

CAPITOLO 4	Pag 57
Fattori prognostici	Pag 58
CAPITOLO 5	Pag 66
Materiali e metodi	Pag 67
Materiali e metodi per la chirurgia	Pag 70
Materiali e metodi per esame istopatologico	Pag 73
CAPITOLO 6	Pag 80
Risultati dello studio	Pag 81
CAPITOLO 7	Pag 91
Discussione dei risultati e conclusioni	Pag 92
BIBLIOGRAFIA	Pag 97
RINGRAZIAMENTI	Pag 102

Riassunto

Parole chiave: neoplasia mammaria, cagna, istotipo, prognosi, Kaplan-Meyer.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'importanza dell'istotipo, dell'indice mitotico, del grado di differenziazione delle cellule neoplastiche ed il grado di invasività neoplastica come fattori prognostici nelle neoplasie mammarie della cagna. A tale fine i tumori ottenuti da 63 cagne mastectomizzate sono stati classificati secondo caratteristiche morfologiche ed istopatologiche. Per i soggetti portatori di carcinoma è stato inoltre attuato un follow-up post-operatorio di 720 giorni. Dallo studio è emerso che non c'è correlazione significativa tra questi parametri e l'insorgenza di nuove neoplasie mammarie, successive, con localizzazione diversa dalla primaria. E' stata, invece, rilevata correlazione significativa tra un elevato indice mitotico ed uno scarso grado di differenziazione cellulare e l'insorgenza di recidive e metastasi. Infine, tale correlazione esiste anche tra il verificarsi della morte del soggetto, per cause legate al tumore mammario, e l'istotipo, un elevato indice mitotico, uno scarso grado di differenziazione cellulare ed il grado di invasività neoplastica.

Abstract

Key-words: mammary neoplasm, bitch, histotype, prognosis, Kaplan-Meyer.

The purpose of our study was to estimate histotype, mitotic index, tumor grade and neoplasm staging importance as prognostic factors in bitch mammary neoplasms. Tumors obtained from sixtythree bitches were classified, according to morphological and histopathological characteristics. Dogs bearing mammary carcinomas were also submitted to a two-year follow-up. No significant association between evaluated parameters and presence of new mammary tumors arising in different sites from the site of primary neoplasms was observed, while a significant association between a high mitotic index, low grade of cellular differentiation, recurrence, and metastasis was present.

A significant association between tumor related death, and histotype, high mitotic index, low grade of cellular differentiation, and neoplasm staging was finally detected.

INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni la figura del cane ha assunto un ruolo sociale sempre più rilevante; la maggior attenzione dei proprietari nell'alimentazione e nelle cure mediche dei propri animali, ha portato ad un aumento della vita media del cane e ad una maggior frequenza delle patologie dell'età adulta, come le neoplasie mammarie.

In quest'ultimo decennio l'approccio elettivo per tali patologie è stato unicamente quello chirurgico; solo ultimamente si sta cercando di affiancare anche un esame successivo all'intervento, fondamentale per effettuare una diagnosi esatta: l'*esame istopatologico*.

L'intento di questo studio è stato proprio quello di valutare la reale importanza di tale esame, e quindi l'effettivo valore prognostico dell'istotipo per un soggetto affetto da neoplasia mammaria.

A tale scopo, abbiamo raccolto i risultati di esami istopatologici effettuati sul materiale asportato da 63 soggetti affetti da neoplasie mammarie e per questo mastectomizzati; successivamente, per i soggetti portatori di carcinoma, abbiamo effettuato un follow-up di 2 anni post-chirurgia ed abbiamo correlato le informazioni apprese durante questo intervallo di tempo, riguardo all'insorgenza di nuove neoplasie e/o recidive e/o metastasi e sull'eventuale decesso del soggetto con relativa causa, con i risultati dell'esame istopatologico.

Infine, abbiamo valutato se tali associazioni fossero statisticamente significative o meno.

CAPITOLO 1

ANATOMIA DELLA MAMMELLA DELLA CAGNA

ANATOMIA DELLA MAMMELLA DELLA CAGNA

Le mammelle sono una caratteristica peculiare dei mammiferi. Precisamente sono ghiandole cutanee specializzate con funzione secretoria: il secreto è il latte.

Durante la vita embrionale si riscontrano in entrambi i sessi; successivamente, se nel maschio nella vita adulta permangono rudimentali o scompaiono, nella femmina si sviluppano al raggiungimento della pubertà, raggiungono le dimensioni massime al termine di un'eventuale gravidanza e diventano attive dopo il parto.

Alla fine del periodo dell'allattamento si prosciugano e con il passare del tempo riassumono le usuali dimensioni.

NUMERO E TOPOGRAFIA

Di solito nella cagna si riscontrano 5 paia di mammelle: 2 paia toraciche, 2 paia addominali ed un paio inguinale. A volte, soprattutto nei cani di grossa taglia, si possono trovare eccezioni nel numero.

Le mammelle si estendono per due file parallele paramediane dalla regione toracica a quella prepública; non sempre la simmetria è rispettata, ed alcune mammelle assumono posizioni alternate.

La loro posizione durante i periodi d'inattività è indicata quasi unicamente dalla presenza delle papille.

CONFORMAZIONE ED ANOMALIE

La conformazione delle mammelle nella cagna non è costante durante la vita dell'animale, ma cambia secondo lo stato funzionale.

Durante i periodi d'inattività le mammelle sono appianate e difficilmente isolabili l'una dall'altra; durante la lattazione invece, che si riscontra sia in seguito al parto sia alla fine della "pseudogravidanza", aumentano di volume, diventano coniche, leggermente appiattite lateralmente, ed i corpi mammari entrano in contatto con quelli vicini, da cui sono distinti grazie a dei profondi solchi trasversali.

A partire dalla quarta settimana di gravidanza le file mammarie di destra e di sinistra a loro volta prendono contatto tra loro, restando divise dal solco intermammario che si approfondisce.

Il volume delle mammelle non aumenta per tutte nello stesso modo: quelle pettorali hanno un incremento delle dimensioni minore rispetto a quelle inguinali, che, se a riposo si presentano abbozzate, durante la lattazione hanno lo sviluppo maggiore.

Nelle femmine che non hanno mai avuto una lattazione le papille si ritrovano invaginate in una depressione cutanea e si presentano corte e ottuse. Successivamente si allungano e si arrotondano alle estremità, fino a raggiungere in lattazione una lunghezza di 10-12 mm o più a seconda della razza.

Le anomalie delle mammelle sono abbastanza frequenti nel cane.

Quando una o più mammelle sono di volume esagerato, in assenza di stati patologici o particolari momenti funzionali, si parla di macromastia.

La micromastia invece è quando uno o più corpi mammari si presentano ipoplasici. Frequenti anche le anomalie a carico della papilla, come la macro e la microtelia.

Polimastia o ipermastia indicano lo stato di mammelle soprannumerarie, che se si trovano in vicinanza di una mammella normale sono definite mammelle accessorie; se ne mancano una o più si parla invece di oligomastia o ipomastia.

Se si riscontrano due papille per uno stesso corpo mammario si parla di politelia o ipertelia; al contrario l'assenza di una o più papille si definisce oligotelia o ipotelia ed è tipico del maschio.

STRUTTURA

Da un punto di vista strutturale la mammella è costituita dal corpo della mammella e dalla papilla della mammella o capezzolo.

Il primo si compone dalla pelle, da un rivestimento di tessuto connettivo elastico che costituisce l'apparato sospensore, e da un parenchima ghiandolare che viene sorretto da un'impalcatura connettivale. Il capezzolo si trova sulla parte più rilevata della mammella come un prolungamento cilindroide.

Le mammelle di un lato sono sempre anatomicamente separate da quelle dell'altro lato da un setto mediano, dato dall'addossamento degli apparecchi sospensori delle ghiandole rispettive. Tra i due lati esiste indipendenza funzionale.

Tegumento

Il tegumento o pelle è aderente all'involucro fibroelastico e si presenta morbida e ricca di ghiandole sudoripare e sebacee. Nelle vicinanze della papilla si riscontrano ghiandole sebacee di volume ridotto e ghiandole sudoripare di maggior volume, entrambe annesse a follicoli di peli fini e corti.

Apparato sospenditore

L'apparato sospenditore è formato da tessuto connettivo elastico che si continua esternamente con il derma della pelle, ed internamente con l'impalcatura connettivale che sostiene il parenchima.

Tale apparato assume la forma di sacco che va ad avvolgere completamente la ghiandola se è unica, mentre se le ghiandole sono numerose negli intervalli tra le successive diventa indistinto.

Il corpo ghiandolare della mammella, accolto nella tela sottocutanea, è in rapporto dorsalmente con la fascia profonda del tronco o foglietto profondo della fascia esterna del tronco, che si interpone tra la base della mammella e la fascia dei muscoli sovrastanti, dove costituisce la fascia mammaria profonda. Quest'ultima ai lati di ogni corpo ghiandolare dà origine a due propaggini laminari che formano, portandosi verso il capezzolo, la fascia mammaria superficiale.

Parenchima mammario

Il parenchima mammario, costituente principale del corpo della mammella, è sostenuto da un'impalcatura connettivale che è in continuità, perifericamente, con l'apparato sospenditore della ghiandola, ed internamente con il connettivo intralobulare, dividendo così il tessuto nobile in lobi e lobuli. Questo connettivo di sostegno è ricco di fibre collagene ed elastiche e di tessuto adiposo, presente soprattutto nella parte dorsale della ghiandola e nei periodi di inattività.

Il connettivo mammario, presente maggiormente fino alla pubertà, successivamente si riduce formando dei setti che durante i periodi di secrezione si assottigliano ulteriormente per la proliferazione degli alveoli; all'interno dei setti scorrono vasi e nervi.

Nel cane la mammella si definisce composta, in quanto il corpo ghiandolare è composto da più ghiandole mammarie, ognuna con un proprio sistema di dotti escretori ed ostio papillare; istologicamente sono ghiandole apocrife, tubuloalveolari composte.

L'alveolo ghiandolare è l'unità funzionale e secernente della ghiandola mammaria; ha la forma di un tubulo irregolarmente dilatato rivestito da un epitelio cubico semplice appoggiato su di una membrana basale, con evaginazioni sacciformi o ramificazioni. Infine c'è uno strato discontinuo di cellule mioepiteliali o cellule a canestro o ancora mioepiteliociti stellati che, approfondendosi tra la membrana basale e l'epitelio ghiandolare, forma una rete la cui contrazione ne facilita la liberazione del contenuto.

I lattociti sono le cellule ghiandolari; a seconda del momento funzionale subiscono cambiamenti: se sono a riposo si presentano bassi, cuboidali e citoplasma scarso, durante la secrezione invece sono

alte con citoplasma abbondante che fa protendere l'estremità apicale nel lume ghiandolare.

Da ogni alveolo mammario parte un condotto alveolare, con la medesima struttura e funzione; quest'ultimo si continua con il dotto intralobulare che invece presenta un epitelio basso senza attività secernente.

Si definisce lobulo l'insieme delle unità tubulo-alveolari che sboccano all'interno di un condotto intralobulare; i lobuli vengono drenati dai condotti interlobulari il cui epitelio assume un aspetto stratificato. Infine i condotti interlobari confluiscono nei dotti lobari che a loro volta si raccolgono nel condotto lattifero o condotto galattoforo, che presenta un calibro grosso, irregolare, un epitelio bistratificato cubico e cellule muscolari abbondanti.

I condotti lattiferi arrivando alla base della papilla si dilatano nel seno lattifero che ha la funzione di serbatoio per il latte: qui lo strato di cellule muscolari lisce diventa più netto e quello fibroelastico più spesso.

Ad ogni condotto corrisponde un proprio seno, che può avere una parte ghiandolare ed una papillare, che comunica con l'esterno tramite un condotto papillare.

Papilla

La papilla della mammella è lo sbocco dei condotti terminali delle vie di escrezione del latte, intorno ai quali nel derma si forma uno sviluppato plesso vascolare.

Sulla sommità della papilla si ritrovano generalmente da 8 a 12 osti, più raramente da 4 a 22; esistono osti periferici disposti

perifericamente, ed osti centrali, di dimensioni maggiori e disposti irregolarmente.

Da ogni ostio ha origine un condotto papillare, il cui epitelio pavimentoso stratificato si continua qui nell'epidermide del rivestimento cutaneo.

Intorno ai condotti papillari si ritrovano cellule muscolari lisce a formare uno sfintere in numero maggiore e con disposizione diversa rispetto a quelle che circondano i seni lattiferi, piccole cavità che si estendono nel terzo distale della papilla.

EVOLUZIONE E CONTROLLO ORMONALE

Fino alla pubertà la mammella si presenta ricca di tessuto connettivo, con lobuli piccoli costituiti solo da condotti escretori: tale aspetto è lo stesso che si ritrova nella vita fetale. Successivamente abbiamo un accrescimento di volume dovuto sia ad un aumento ulteriore di tessuto connettivo che s'infiltra di grasso, sia ad un arborizzazione dei condotti dei lobuli sotto l'azione ormonale.

Lo sviluppo alveolare avviene invece più lentamente; a metà gestazione sono formati e poi cavitati, si completa poi solo in seguito all'azione combinata di estrogeni, progesterone, prolattina e ormone somatotropo come avviene al termine della gravidanza. In questo momento si ha un aumento della circolazione, l'epitelio ghiandolare da basso e inattivo diventa cubico e nel connettivo intralobulare s'infiltrano linfociti e plasmacellule.

Il primo prodotto della mammella è il colostro, che ha proprietà lassative ed è ricco di anticorpi; questo secreto si presenta giallo e viscoso. Secondariamente, dopo alcuni giorni, avremo il latte,

che occuperà gli alveoli da esso allargati. La secrezione lattea si ha in seguito alla stimolazione meccanica della poppata, grazie all'attivazione di un riflesso neuroendocrino. Tale riflesso è preposto all'allontanamento del latte dalla ghiandola ed è costituito da un arco riflesso dove la componente afferente è data dagli stimoli nervosi mentre quella efferente dall'ossitocina. La deformazione dei meccano-recettori capezzolari determinata dalla suzione provoca l'insorgenza di impulsi nervosi che vengono trasmessi attraverso i nervi mammari al midollo, nel quale viaggiano nel tronco dorsale spinale fino all'ipotalamo, ed in particolare a livello delle cellule neurosecretrici dei nuclei sopraottico e paraventricolare responsabili della sintesi dell'ossitocina. L'ormone, legato ad una specifica proteina (neurofisina I), con il circolo giunge alla ghiandola dove, liberato dalla componente proteica, si lega a specifici recettori delle cellule mioepiteliali e ne determina la contrazione. Questa contrazione, pur causando un considerevole aumento della pressione endomammaria, non riesce a superare la resistenza opposta dallo sfintere del dotto papillare capezzolare, resistenza che può esser vinta grazie all'aiuto della suzione, ed è mantenuta dalla prolattina e dall'ormone somatotropo, entrambi di origine ipofisaria; l'ossitocina invece, di natura ipotalamica, agisce sui mioepiteliociti determinando così l'eiezione lattea.

Alla fine dell'allattamento s'interrompono i riflessi neurormonali; di conseguenza gli alveoli regrediscono ed il tessuto connettivo diventa nuovamente la componente più rappresentata, fino alla successiva gravidanza.

In vecchiaia la mammella entra in involuzione senile; gli alveoli gradualmente scompaiono insieme ai condotti ed il tessuto

connettivo prevale, seppur meno ricco di cellule. A volte alcuni residui ghiandolari invece di scomparire vanno incontro ad evoluzione cistica.

IRRORAZIONE ED INNERVAZIONE

Arterie

Le mammelle toraciche ricevono il sangue cranialmente da rami perforanti dell'arteria toracica interna che passano attraverso l'estremità ventrale degli spazi intercostali, medialmente dall'arteria epigastrica craniale superficiale e lateralmente da rami mammari delle arterie intercostali e dall'arteria toracica laterale, ramo dell'arteria ascellare.

Le mammelle addominali e quelle inguinali sono irrorate dall'arteria epigastrica superficiale craniale e dall'arteria epigastrica superficiale caudale, che si anastomizzano sulla loro faccia dorsale. Le mammelle inguinali sono raggiunte anche da alcuni rami provenienti dall'origine dei rami labiali ventrali delle arterie pudende esterne.

Le dimensioni delle arterie cambiano a seconda dello stato funzionale della ghiandola; sono anastomizzate tra di loro e si ramificano nei setti della ghiandola portandosi ai lobuli fino a risolversi in una fittissima rete capillare a circondare gli alveoli e ad accompagnare i condotti lattiferi. Alcuni rami arrivano fino alla papilla, dove si anastomizzano sia fino all'estremità della stessa che ad i seni lattiferi.

Vene

Alla base della papilla si forma un cerchio venoso ed un altro, più esteso ma incompleto, alla base della mammella.

Le vene sono satelliti delle arterie ma sono di maggiori dimensioni ed anastomosi. Le mammelle toraciche sono drenate dalla vena epigastrica superficiale craniale; quelle inguinali e le addominali caudali dalla vena epigastrica superficiale caudale e dalla vena pudenda esterna.

Le mammelle addominali craniali sono drenate da entrambi i sistemi.

Linfatici

Alla base della papilla in ogni mammella origina una rete capillare anulare a maglie fitte che drena sia la stessa papilla sia il parenchima; essa si continua in una rete sottocutanea da cui emergono, alla base del corpo mammario, 2-3 efferenti che si anastomizzano in parte con quelli delle ghiandole vicine e si portano ai linfonodi delle regioni corrispondenti.

Le mammelle toraciche sono drenate dai linfonodi ascellari che generalmente sono singoli per lato, a volte duplici; si trovano 4 cm caudalmente e centralmente all'articolazione della spalla. In alcuni casi si riscontra più caudalmente un piccolo linfonodo accessorio; eccezionalmente alcuni efferenti drenano direttamente nel torace ai linfonodi sternali.

I linfatici delle mammelle inguinali e di quelle addominali caudali si dirigono ai linfonodi mammari inguinali superficiali o

mammari, che sono 1-2 per lato sulla faccia dorsale della mammella inguinale.

Le mammelle addominali craniali spesso sono drenate contemporaneamente da entrambi i gruppi di linfatici.

Nervi

L'innervazione decorre nei setti fino ad arborizzarsi intorno agli alveoli; è prevalentemente di fibre di tipo sensitivo, a cui si associano fibre del sistema simpatico, ad azione vasomotrice, che provengono dai gangli corrispondenti della catena latero-vertebrale. Il sistema parasimpatico non sembra partecipare. L'attività delle cellule ghiandolari e dei mioepiteliociti è fondamentalmente sotto controllo ormonale.

A livello della papilla le fibre sensitive formano dei plessi dove prendono contatto con corpuscoli tattili capsulati (corpuscoli di Meissner) e non capsulati (corpuscoli di Merkel), che sono importanti per l'attivazione del riflesso neuroormonale e dell'attività ghiandolare durante la poppata o la mungitura.

CAPITOLO 2

**APPROCCIO CLINICO,
DIAGNOSTICO E
TERAPEUTICO PER
LE NEOPLASIE
MAMMARIE DELLA
CAGNA**

APPROCCIO CLINICO, DIAGNOSTICO E TERAPEUTICO PER LE NEOPLASIE MAMMARIE DELLA CAGNA.

INCIDENZA E FATTORI DI RISCHIO.

I tumori mammari sono le neoplasie più frequenti nella cagna: rappresentano il 25 % di tutti i tumori nel cane ed il 50 % di tutti i tumori nelle cagne.

E' importante tener presente che circa il 50% delle neoplasie mammarie sono benigne (Marconato e Del Piero, 2005).

Nel cane maschio, si riscontrano con un'incidenza inferiore a 1 %, spesso associati alla contemporanea presenza di neoplasie testicolari che producono ormoni, soprattutto sertoliomi secernenti estrogeni.

Le razze più colpite variano a seconda della localizzazione geografica in cui è stato effettuato lo studio, ma sembra che ci sia una maggiore incidenza di neoplasie mammarie in Toy, English Springer Spaniels, Brittany Spaniels, Cocker Spaniels, English Setters, Pointers, German Shepherds, Maltese e Yorkshire Terriers (Goldschmidt et al., 2001; Yamagami et al., 1996). Secondo un recente studio retrospettivo sembra che, nelle razze di piccola taglia, l'incidenza dei tumori maligni sia inferiore che nelle razze di grossa taglia, sia per comportamento biologico sia istologicamente (Marconato e Del Piero, 2005).

Sembra inoltre che le ghiandole mammarie addominali caudali ed inguinali siano quelle maggiormente interessate dai tumori, forse a causa della maggior quantità di tessuto mammario presente o perché soggette ad alterazioni più marcate in risposta agli estrogeni, mentre non si osserva una maggiore frequenza a carico di una fila rispetto ad un'altra (Marconato e Del Piero, 2005).

I fattori di rischio sono molteplici, ma alcuni tra questi hanno maggior responsabilità.

I tumori mammari nella cagna sono sia età sia ormono dipendenti. L'incidenza, infatti, aumenta con l'età: a 6 anni è pari a 1 %; a 8 anni, 6%; a 10 anni, 13% (Egenvall et al., 2005). L'età media di comparsa della neoplasia mammaria è tra i 10 e gli 11 anni, raramente prima di 4 anni (Withrow e Vail, 2007).

Dal punto di vista ormonale, è accertata l'influenza dell'attività estrale, poiché l'ovariectomia, se effettuata precocemente nella vita del cane, riduce notevolmente il verificarsi di tumori mammari. In particolare si è riscontrato che l'ovariectomia effettuata prima del primo calore riduce il rischio di tumori mammari dell'80%, tra il primo ed il secondo del 40%; oltre il secondo calore un eventuale intervento non riduce più la comparsa della neoplasia (Marconato e Del Piero, 2005). Secondo altri autori invece, si ha con l'ovariectomia una riduzione del rischio fino al 4° calore.

Sono colpite, infatti, prevalentemente femmine intere o ovariectomizzate in età avanzata.

Sull'effettuare o meno l'ovariectomia durante l'intervento di mastectomia esistono opinioni discordanti: uno studio recente riporta una maggior sopravvivenza in soggetti ovaristerectomizzati nei 2 anni che precedono la comparsa della neoplasia o al momento della

mastectomia, rispetto che in cagne che rimangono intere o vengono castrate prima dei 2 anni antecedenti l'insorgenza del tumore (Sorenmo et al., 2000).

Per quanto concerne la correlazione tra ormoni e sviluppo di neoplasie mammarie si è riscontrato che l'utilizzo di progestinici long acting per prevenire l'estro, può comportare l'insorgenza di neoplasie mammarie benigne; la somministrazione di estrogeni invece non ne dà un aumento di incidenza (Rutteman, 1992).

L'utilizzo invece di progestinici ed estrogeni insieme e ad alte dosi aumentano l'incidenza di tumori maligni (Rutteman e Misdorp, 1993). Anche la prolattina sembra avere un ruolo nella patogenesi dello sviluppo tumorale: sono stati scoperti, infatti, recettori per tale ormone nel 30 % di tumori mammari benigni.

Anche la genetica gioca un ruolo importante: nei tumori mammari del cane sono stati osservate alterazioni genetiche come l'attivazione di protooncogeni cellulari, la disattivazione o perdita di geni soppressori come p53 e anomalie a livello di DNA nucleare; l'aneuploidia poi si associa a prognosi infausta, probabilmente perché indice di intensa proliferazione cellulare.

Sull'eventuale importanza dell'obesità per lo sviluppo tumorale, accertata come fattore di rischio nelle donne in età menopausale, ci sono pareri discordanti: c'è chi ritiene esista una correlazione significativa tra aumento eccessivo di peso e incidenza di neoplasie mammarie e chi non vi attribuisce importanza (Marconato e Del Piero, 2005).

Secondo alcuni l'obesità giovanile sembra comportare un aumento del rischio; inoltre si ipotizza che una dieta casalinga possa essere

collegata ad un maggior rischio di quella commerciale, forse per un maggior contenuto di grassi (Perez-Alenza et al., 1998).

STADIAZIONE CLINICA DEL TUMORE: TNM

La stadiazione clinica di una neoplasia rappresenta una fase obbligatoria nell'approccio al paziente neoplastico: ci si basa sulla classificazione TNM proposta dal World Health Organization (WHO), modificata da Owen nel 1980 (Dobson e Lascelles, 2003).

Tale classificazione considera, da un punto di vista clinico, l'estensione anatomica di una neoplasia. E' utile sia perché permette uno scambio di informazioni tra i medici mediante un linguaggio "standardizzato", sia perché aiuta a pianificare la giusta terapia, ci dà un'indicazione prognostica e valuta e confronta risultati terapeutici.

Esistono 3 categorie nella valutazione dell'estensione tumorale: tumore primitivo (T), stato dei linfonodi regionali (N) e presenza di metastasi distanti (M):

- T: estensione del tumore primitivo.
 - ✓ T₁: lesione non macroscopicamente visibile.
 - ✓ T₂: diametro massimo del tumore < 3 cm.
 - ✓ T₃: diametro massimo 3-5 cm.
 - ✓ T₄: diametro > 5 cm.
- N: condizione dei linfonodi regionali (ascellari, sternali craniali, inguinali superficiali, iliaci mediali).
 - ✓ N₀: linfonodi regionali istologicamente non coinvolti.
 - ✓ N₁: linfonodi ipsilaterali istologicamente coinvolti.
 - ✓ N₂: linfonodi controlaterali istologicamente coinvolti.
- M: presenza o assenza di metastasi a distanza.

- ✓ M_0 : nessuna evidenza di metastasi a distanza.
- ✓ M_1 : metastasi presenti (specificare sede).

Con le informazioni raccolte, il paziente può quindi essere inquadrato in uno dei seguenti stadi clinici:

- ✓ Stadio I: $T_1N_0M_0$
- ✓ Stadio II: $T_{1-0}N_1M_0$ o $T_2N_{1-0}M_0$
- ✓ Stadio III: $T_3N_{\text{qualsiasi}}M_0$ o $T_{\text{qualsiasi}}N_2M_0$
- ✓ Stadio IV: $T_{\text{qualsiasi}}, N_{\text{qualsiasi}}M_1$ o $T_4N_{\text{qualsiasi}}M_{\text{qualsiasi}}$

APPROCCIO DIAGNOSTICO: LINEE GUIDA

In assenza di altri sintomi, il soggetto viene portato dal veterinario perché il proprietario ha osservato la presenza di uno o più noduli non dolenti in corrispondenza della ghiandola mammaria. Altre volte invece, è il veterinario stesso che ne rileva la presenza, in corso di una visita di controllo o per altra causa.

Per seguire un corretto iter diagnostico, la prima cosa da fare è prendere nota delle rispettive dimensioni (informazione da cui dedurremo la componente T della successiva stadiazione clinica) e consistenza, della localizzazione dei tumori mammari e se si presentano come masse singole o multiple; si dovrà poi osservare attentamente le condizioni della cute sovrastante, se si presenta intatta, infiammata o ulcerata.

Inoltre è importante domandare al proprietario da quanto tempo è insorta la neoformazione, (tempo d'insorgenza), e se c'è stato o no un aumento di volume nel tempo (progressione). Bisogna chiedere inoltre se il soggetto è stato sottoposto a trattamenti ormonali.

E' fondamentale poi effettuare la palpazione manuale dei linfonodi ascellari ed inguinali per riscontrare un'eventuale linfadenomegalia: se è presente un aumento di volume bisogna eseguire un FNA (Fine Needle Aspiration, ago aspirato), che se risulta positivo ci dà già la componente N, fondamentale per la stadiazione clinica del tumore.

A questo punto si può effettuare un esame citologico della neoformazione, che è semplice e veloce da eseguire. Il prelievo citologico è poco invasivo ed evita di contaminare il campione da esaminare con parti superficiali della lesione in oggetto. Questa metodica prevede l'utilizzo di un ago di Gauge variabile (21-27) con l'ausilio o meno di una siringa da 5-20 ml. Non dovrebbero essere impiegati aghi di calibro maggiore, per il rischio di contaminare eccessivamente il campione con sangue (Romanelli, 2007).

In ogni caso è fondamentale, soprattutto se dobbiamo campionare lesioni di grosse dimensioni, effettuare il campionamento in periferia evitando così possibili aree centrali di necrosi; ancora è bene ripetere la manovra almeno 2 o 3 volte per ottenere un numero adeguato di vetrini da esaminare.

Il prelievo citologico può essere effettuato con due manualità distinte: la tecnica dell'agoaspirazione o quella dell'agoinfissione. L'agoaspirazione consiste nell'infissione di un ago nella lesione, previa detersione della zona mediante soluzione fisiologica e garze; all'ago è connessa una siringa, che ci consente di applicare il vuoto mediante aspirazione con lo stantuffo. La pressione negativa esercitata con lo stantuffo viene rilasciata prima di fuoriuscire con l'ago dalla lesione.

L'agoinfissione prevede la stessa manovra dell'esame precedente, senza però effettuare aspirazione: in questo modo il materiale risale per capillarità all'interno dell'ago. Con questa tecnica si ottiene una quantità di materiale decisamente inferiore rispetto alla prima, ma le cellule mantengono maggiore integrità non essendo stressate dalla pressione negativa.

Un buon protocollo è quello di effettuare prima la tecnica dell'agoaspirato, e, se questa non ci dà risultati soddisfacenti, procedere all'applicazione dell'agoinfissione.

All'esecuzione della citologia però, si deve considerare l'eterogeneità della massa da campionare: infatti, all'interno della neoformazione possiamo ritrovare sia cellule adenomatose, che flogistiche, neoplastiche o ancora necrotiche (ad esempio nel carcinoma). Questa composizione comporta che la tecnica del FNA è altamente specifica ma poco sensibile, in quanto c'è un'altissima probabilità di avere falsi negativi.

Se invece attraverso questa tecnica troviamo cellule neoplastiche, possiamo allora diagnosticare con certezza la forma tumorale.

Nonostante i limiti sopracitati è sempre consigliabile eseguire tale procedura poiché, seppur raramente, è possibile nella mammella lo sviluppo di neoplasie di origine non epiteliale (mastocitoma, sarcoma, etc.) che devono essere individuate al fine di approcciarle con stadiazione e tecnica chirurgica appropriata.

Il FNA ci può dare un risultato positivo o negativo:

A. Se il risultato del FNA è negativo e sono presenti pochi noduli (1-2), in considerazione del fatto che circa il 50% delle neoformazioni mammarie del cane sono benigne, si effettua una nodulectomia (biopsia) e sul tessuto asportato si fa successivamente l'esame

istopatologico. Se questo ci conferma l'esito di negatività l'intervento effettuato è terapeutico.

B. Se invece il risultato del FNA è positivo, o se è negativo ma sono presenti dei noduli multipli oppure un nodulo di dimensioni > 1 cm e/o ulcerato può essere opportuno optare direttamente per la mastectomia.

Prima di procedere alla chirurgia radicale (mastectomia), come per qualsiasi neoplasia maligna o sospetta tale, è necessario mettere in essere esami collaterali di diagnostica per immagini finalizzati alla ricerca di eventuali metastasi a distanza.

I carcinomi mammari metastatizzano per via linfatica ai linfonodi regionali, per poi raggiungere attraverso i vasi linfatici più grandi la circolazione sanguigna ed infine i polmoni. Allo scopo di valutare tale evenienza, si eseguono routinariamente radiogrammi del torace in 3 proiezioni (LL dx – LL sx e VD). Per un'interpretazione corretta è indispensabile che il parenchima polmonare sia ben insufflato in modo da ottenere con l'aria un contrasto adeguato.

Bisogna puntualizzare però che la radiografia è una tecnica con una sensibilità pari al 65-72 % (Suter e Lord, 1974), quindi bassa. Infatti, ci consente di visualizzare solo quei noduli che hanno raggiunto un diametro di almeno 4 o 5 mm: di conseguenza c'è il rischio di avere falsi negativi (Marconato e Del Piero, 2005).

Le metastasi polmonari da tumore mammario nel cane si manifestano di solito sottoforma di noduli multipli ben delineati, di varie dimensioni e sparsi a livello del parenchima, più raramente possono essere singole.

Nel caso di neoformazioni parenchimatose singole è fondamentale riuscire a discriminare forme neoplastiche primarie da quelle

metastatiche. Per far questo si può far ricorso ad indagini immunoistochimiche su campioni prelevati.

Frequentemente le metastasi, se di diametro inferiore a 4 mm, possono avere distribuzione interstiziale diffusa. Nel cane, raramente, è presente versamento pleurico; a volte è interessato il linfonodo sternale.

Nei casi dubbi si può effettuare una TAC (Tomografia Assiale Computerizzata) per la valutazione del torace; tale esame è altamente sensibile e specifico nell'identificazione di lesioni di tipo infiammatorio e neoplastico anche di piccole dimensioni: è in grado, quindi, di identificare la presenza di metastasi in anticipo rispetto alla Radiologia convenzionale. Infatti, pur condividendo lo stesso principio fisico (raggi X), la TAC rispetto alla Radiografia convenzionale ha il vantaggio di evidenziare anche minime differenze di densità tra i tessuti di un organo grazie alla sua maggiore risoluzione.

Seppur con minor frequenza rispetto al polmone, anche l'addome, ed in particolar modo fegato e linfonodi sottolombari, possono essere colpiti da fenomeni metastatici da carcinoma mammario.

La tecnica di elezione per tale indagine a livello addominale è l'ecografia. Le metastasi da carcinoma su organi parenchimatosi hanno aspetto patognomónico: aree ipoecogene di lisi alternate ad aree iperecogene di produzione. Tale alternanza conferisce loro il tipico aspetto ecografico "a bersaglio".

L'ecografia può essere utile anche per differenziare una lesione benigna da una maligna: i tumori mammari maligni presentano in genere margini irregolari, sono pleomorfi ed eterogenei dal punto di

vista ecogenico; al contrario quelli benigni hanno margini distinti, regolari, sono sferici od ovoidali e hanno pattern ecografico interno omogeneo.

In caso di lesioni di aspetto dubbio, è sempre opportuna l'esecuzione di FNA ecoguidato con successivo esame citologico; la stessa procedura deve essere applicata in caso di linfadenomegalia di linfonodi addominali.

Per porre il sospetto di eventuali metastasi ossee, comunque rare nel cane, è opportuna un'attenta valutazione del soggetto al fine di evidenziare zoppie anche lievi e procedere ad un'ispezione del costato, della colonna e delle articolazioni. Le zone sospette saranno sottoposte ad esame radiografico. La scintigrafia rimane comunque l'esame di elezione per questo tipo di indagine, ma risulta ancora poco praticabile in ambito veterinario.

Le indagini collaterali di diagnostica per immagini sopra esposte dovrebbero permetterci di inquadrare la M nell'ambito della stadiazione clinica.

Nel caso in cui, attraverso indagini di diagnostica per immagine, siano osservate metastasi, sarà certamente necessaria l'impostazione di una terapia medica in associazione o meno alla chirurgia. Il riscontro di metastasi a distanza deve portare alla considerazione della neoplasia non più come patologia d'organo, ma come patologia sistemica, e nel caso in cui si optasse comunque per un approccio anche chirurgico questo non potrà avere velleità terapeutiche ma soltanto palliative. Nel caso invece non siano riscontrate metastasi, la chirurgia viene effettuata a scopo terapeutico.

In previsione dell'intervento chirurgico, per valutare le condizioni del soggetto devono essere eseguiti anche un esame emocromocitometrico, l'ematochimica ed il profilo coagulativo. Per quanto riguarda i risultati degli esami del sangue, non sono specifici nel caso delle neoplasie mammarie, ma sono importanti per identificare eventuali problemi geriatrici concomitanti o sindromi paraneoplastiche.

Con l'ematochimica spesso si riscontra aumento della fosfatasi alcalina, forse secondario alla produzione di un isoenzima da parte delle cellule mioepiteliali o, all'induzione dell'isoenzima corticosteroidi-indotto evocato dallo stress cronico, o ancora all'attività delle cellule neoplastiche che vanno incontro a metastasi ossea.

CHIRURGIA

Esistono diversi tipi di chirurgia:

A) Chirurgia preventiva: è quella che si effettua quando si fa un'ovariectomia precoce per ridurre l'incidenza di futuri possibili tumori mammari, come già spiegato sopra.

B) Chirurgia diagnostica: si fa quando effettuiamo una biopsia escissionale che ci dà indicazioni sull'istotipo, sul grado e sull'espressione recettoriale; sono valutazioni importanti per la programmazione dell'approccio chirurgico ed eventuali terapie postoperatorie. Ci dà anche informazioni sulla prognosi.

C) Chirurgia terapeutica: prevede la completa rimozione chirurgica di una neoplasia localizzata. E' l'unico tipo di chirurgia con velleità terapeutiche a patto che ci sia la totale asportazione di tessuto neoplastico al primo approccio chirurgico.

Dalla chirurgia terapeutica sono esclusi i soggetti con processi metastatici diagnosticati, poiché in tal caso la neoplasia non è più una patologia d'organo ma una patologia sistemica.

D) Chirurgia palliativa: è riservata a quei soggetti con processi neoplastici metastatizzati o in cui è impraticabile l'asportazione completa della neoplasia. E' importante essere chiari con il proprietario poichè questa chirurgia migliora la qualità della vita del soggetto ma non ne aumenta l'aspettativa. Vi si ricorre per ridurre le dimensioni della neoplasia quando queste comportino impedimento alle normali attività del soggetto, o quando la massa risulti ulcerata e/o infetta.

Esistono diverse procedure chirurgiche verso cui il chirurgo può orientarsi:

- Nodulesctomia: prevede la rimozione unicamente della neoformazione mammaria. E' da considerarsi una biopsia, cioè una procedura diagnostica, che diventa terapeutica in caso di lesioni benigne.
- Mastectomia: consiste nell'asportazione di una o più mammelle in base alla localizzazione della o delle neoformazioni tenendo conto del drenaggio linfatico.

E' molto importante tener presente il drenaggio linfatico secondo la localizzazione della neoplasia: le mammelle T1 e T2 sono drenate dai linfonodi ascellari e sternali, che affluiscono poi nel dotto toracico da cui nel circolo ematico; le mammelle A2 e I vanno ai linfonodi inguinali superficiali da cui ai linfonodi iliaci mediali, quindi tronco comune, cisterna chilosa ed infine circolo ematico. A1 può drenare in entrambe le direzioni. Nel cane non ci sono comunicazioni tra le file destra e sinistra.

- ✓ Se sono interessate le mammelle T1 e T2: mastectomia regionale craniale, asportazione di T1 e T2 più linfonodo ascellare se è aumentato di volume.
- ✓ Se è localizzato nella mammella A1: mastectomia dell'intera fila, quindi asportazione T1, T2, A1, A2 e I più linfonodo ascellare se aumentato di volume ed inguinale.
- ✓ Se si trova in A2 e I: mastectomia regionale caudale, asportazione A1, A2 e I + linfonodo inguinale.
- ✓ Se sono interessate entrambe le file si possono combinare tali procedure chirurgiche; nel caso in cui questo non fosse possibile nella stessa seduta chirurgica si effettueranno due interventi successivi a distanza di 3 settimane per garantire la completa guarigione e consentire l'espansione tessutale.
- Asportazione linfonodale: si esegue per i linfonodi ascellari solo se sono fissi, aumentati di volume e/o positivi alla citologia; tali linfonodi, infatti, sono molto difficili da rimuovere chirurgicamente. La linfoadenectomia inguinale è invece considerata di prassi associata

all'exeresi della ghiandola inguinale, in quanto viene via insieme a tale mammella.

La loro analisi ci garantirà la corretta stadiazione del tumore.

Se la cagna è intera ed in sede di intervento di mastectomia si vuole effettuare anche l'ovariectomia, è bene farla prima per ridurre il rischio di impianto iatrogeno di cellule neoplastiche in cavità addominale.

Importante tener presente che nel carcinoma infiammatorio è controindicato l'approccio chirurgico.

ESAME ISTOPATOLOGICO

In seguito alla rimozione chirurgica, il materiale deve essere fissato in formalina in un contenitore di dimensioni tali da permettere una totale immersione del pezzo e che esso non subisca compressioni dalle pareti.

Nel caso in cui venga inviato al patologo tutto il tessuto mammario asportato, il chirurgo deve localizzare con un nodo la posizione di tutti i noduli presenti perché tutti vengano analizzati, potendo avere tra loro istotipi diversi.

Insieme al tessuto mammario escisso, viene sempre inviato anche il linfonodo regionale asportato, la cui valutazione istopatologica ci fornisce la valutazione di N nella stadiazione.

E' importante associare al tessuto prelevato dati riguardanti l'età del soggetto, la razza, la taglia, il peso, la regione topografica interessata, il numero e la dimensione dei noduli riscontrati, il tempo di

insorgenza, la progressione, la mobilità, se si tratta di tumori primitivi o di recidive e se c'era o meno linfadenomegalia.

Per classificare correttamente la neoplasia, si può aggiungere l'immunoistochimica indiretta alla colorazione di routine con ematossilina ed eosina.

Quando il patologo invia al clinico la diagnosi effettuata, deve allegare un commento in cui fa uso di determinate parole chiave per descrivere la neoplasia, come: neoplasia benigna o maligna, demarcazione, tipo cellulare, grado di differenziazione (o grado di anaplasia), presenza di capsula, infiltrazione capsulare, stromale e/o vascolare, indice mitotico, percentuale di necrosi, interessamento linfonodale, presenza od assenza di cellule neoplastiche sui margini di rimozione chirurgica ed infiltrazione linfonodale.

I parametri sopraccitati, infatti, sono fondamentali ai fini prognostici, poichè si correlano al comportamento biologico tumorale. Infatti, i criteri morfologici di malignità non sempre sono sufficienti per valutare il comportamento biologico di una neoplasia: ad esempio, l'invasione stromale è molto più significativa del pleomorfismo cellulare. Uno studio ha dimostrato che, se è presente l'invasione stromale, l'80% dei cani affetti da neoplasia mammaria non sopravvive oltre i 2 anni (Marconato e Del Piero, 2005).

A questo punto avremo tutte le informazioni necessarie per studiare la neoplasia secondo il metodo TNM.

CHEMIOTERAPIA

Le indicazioni per la chemioterapia sono: escissione chirurgica incompleta, evidenza istologica d'invasione linfatica, presenza di

metastasi linfonodali, polmonari, ossee o viscerali, recidiva locale e tipo istologico aggressivo (carcinoma invasivo, solido, carcinosarcoma, sarcoma).

I protocolli disponibili prevedono l'utilizzo della doxorubicina in monochemioterapia o in combinazione con la ciclofosfamide e il 5-fluorouracile (Karayannopoulou et al., 2001).

Al termine dei cicli di chemioterapia, la cagna va monitorata ogni 3 mesi per il primo anno, poi ogni 6 mesi e, dopo il secondo anno, il controllo diventa annuale.

TERAPIA ORMONALE

Esiste anche la possibilità di trattare tumori ormonodipendenti con sostanze che modificano i livelli ormonali: tale strategia in medicina veterinaria è stata “ripresa” dalla medicina umana.

Normalmente il tessuto mammario possiede recettori sia per gli estrogeni che per il progesterone, come la maggior parte dei tumori benigni. Nei tumori maligni, che si presentano meno differenziati, si ha una minor espressione recettoriale, che decresce proporzionalmente con l'aumentare della malignità. In uno studio condotto da Millanta e collaboratori, furono valutati l'espressione recettoriale per il progesterone e gli estrogeni su lesioni mammarie: è emerso che il 100% dei tessuti normali e displasici ed il 95% di tumori benigni risultarono esprimere recettori per estrogeni (Millanta et al., 2005).

Si suppone che l'ambiente endocrino del soggetto abbia influenza sull'espressione recettoriale del tumore: se c'è ricchezza di estrogeni

(tipico di una cagna intera), il tumore favorisce il subclone ER+; se invece l'ambiente ne è povero, ci sarà più facilmente l'espressione del subclone ER-. Da questo, si deduce che la neoplasia che si scopre in un soggetto che è rimasto intero fino a quel momento sarà più probabilmente ER+, e quindi, trarrà maggior beneficio dalla terapia ormonale, dalla sterilizzazione ed avrà soprattutto una prognosi migliore.

Da uno studio condotto sui tumori mammari, si evince che castrare una cagna dopo i 2 anni di età potrebbe essere controproducente, poichè selezionerebbe un subclone ER-, quindi con prognosi peggiore e non rispondente ad un'eventuale terapia ormonale: per tanto sarebbe meglio eseguire l'ovariectomia solo se compaiono tumori mammari od in caso di patologia dell'apparato genitale (Marconato e Del Piero, 2005).

Un prodotto utilizzato per la terapia ormonale degli ER+ è il tamoxifene, un antiestrogeno non steroideo di sintesi che compete con gli estrogeni per il medesimo recettore citoplasmatico; il complesso recettore-tamoxifene trasloca nel nucleo, comportando così alterazione dei meccanismi di regolazione della sintesi proteica e inibizione della replicazione cellulare. Quindi tale sostanza ha azione su tumori che possiedono recettori per gli estrogeni.

Il tamoxifene possiede però anche una minima attività estrogenica, che può essere responsabile di endometrite nelle cagne intere: per questo motivo è importante che sia utilizzato solamente su cagne sterilizzate; a volte può dare problemi anche al moncone uterino. Alla luce di quanto detto, ci sono diverse opinioni sul suo utilizzo;

Withrow e colleghi ad esempio, non ne consigliano l'uso (Withrow e Vail, 2007).

La dose consigliata è 0,5-2 mg/kg per os, una volta al giorno per 6 mesi; poi se ben tollerato si può aumentare il dosaggio; il tamoxifene non può essere utilizzato in associazione con chemioterapici citotossici, ma in alternanza successiva (Marconato e Del Piero, 2005).

Recentemente si stanno scoprendo gli antiestrogeni di ultima generazione, come il raloxifene, che è più maneggevole è meno tossico del tamoxifene, e gli inibitori delle aromatasi, che bloccano la sintesi estrogenica.

Inoltre è stato scoperto che a livello mammario esistono dei recettori per l'ormone rilasciante l'ormone luteinizzante (GnRH): utilizzando agonisti di GnRH, come il goserelin, sembra si determini una riduzione dei tumori mammari ER+ PR+, con una tossicità minima (Sorensen, 2003).

RADIOTERAPIA

La radioterapia è un trattamento antineoplastico locale; si utilizza solitamente in seguito ad un intervento chirurgico conservativo per eliminare focolai neoplastici residui e ridurre così eventuali recidive.

Tale trattamento però, non ha azione sul potenziale metastatico e di conseguenza non aumenta la sopravvivenza del soggetto; si può applicare anche a tumori mammari inoperabili per il controllo locale del tumore.

Il protocollo proposto per il carcinoma infiammatorio, per il quale rappresenta l'unico approccio terapeutico, è la somministrazione di frazioni di 8 Gy per 2 o 3 sedute (Withrow e Vail, 2007).

TERAPIA CON ANTINFIAMMATORI NON STEROIDEI

Come in patologia umana, nella ghiandola mammaria sana del cane non c'è espressione della ciclossigenasi-2 (COX-2), che invece è presente nel tessuto neoplastico con una percentuale media del 24% in tumori benigni e del 56% in tumori maligni, in misura crescente con il grado di malignità (Dore et al., 2003).

In uno studio effettuato da Millanta e colleghi sul ruolo del COX2 come indicatore prognostico nei tumori mammari maligni del cane, è stato riscontrato che tale enzima non si trova nei tessuti sani, mentre si osserva nel 100% dei carcinomi invasivi (Millanta et al., 2006).

L'espressione di COX-2 è quindi un importante fattore prognostico.

Sembra che l'utilizzo di FANS antiCOX-2 a scopo antitumorale, come il piroxicam (0,3 ml/kg SID), dia risultati soddisfacenti, anche se, essendo molto limitato il numero di casi considerati, sono necessari ulteriori studi per la conferma dell'utilità terapeutica.

FOLLOW-UP

Il trattamento antineoplastico non si ferma alla terapia, ma è necessario seguire i pazienti nel tempo sia per monitorare un'eventuale ripresa tumorale che per controllare l'apparizione di fenomeni metastatici a distanza.

Alcuni autori consigliano, nei casi di tumori maligni, di effettuare il primo controllo ad un mese dalla chirurgia e, successivamente, per il primo anno ad intervalli di 3 mesi; dopo un anno post chirurgia si eseguono a distanze regolari e vanno ripetuti solitamente a 18 e 24 mesi (Dobson e Lascelles, 2003). Il rischio di recidiva è collegato alla scala in ordine decrescente: carcinomi/sarcomi/carcinosarcomi anaplastici → carcinomi semplici → carcinomi complessi.

Ad ogni controllo si eseguono:

- ✓ visita clinica
- ✓ ispezione e palpazione del sito di exeresi
- ✓ Rx torace (3 proiezioni).
- ✓ ecografia addominale.
- ✓ valutazione dei linfonodi regionali se non asportati.

CAPITOLO 3
CLASSIFICAZIONE
ISTOPATOLOGICA
DELLE NEOPLASIE
NEI CARNIVORI
DOMESTICI

CLASSIFICAZIONE ISTOPATOLOGICA DELLE NEOPLASIE MAMMARIE NEI CARNIVORI DOMESTICI

La classificazione secondo il World Health Organization (WHO) divide i tumori mammari basandosi sull'istotipo; nel 1999 la precedente classificazione del WHO, pubblicata nel 1978, è stata aggiornata e rivista da W. Misdorp (Utrecht, NL), R.W. Else (Edimburg, GB), E. Hellmén (Uppsala, SW) e T.P. Lipscomb (Washington DC, USA). Tale classificazione prevede la suddivisione delle diverse lesioni in forme neoplastiche maligne, benigne ed in forme non neoplastiche, utilizzando lo schema sotto specificato:

➤ Formazioni neoplastiche maligne:

1.1 Carcinoma non infiltrante (in situ)

1.2 Carcinoma complesso

1.3 Carcinoma semplice

✓ 1.3.1 Carcinoma tubulopapillare

✓ 1.3.2 Carcinoma solido

✓ 1.3.3 Carcinoma anaplastico

1.4 Tipi speciali di carcinoma

✓ 1.4.1 Carcinoma a cellule fusate

✓ 1.4.2 Carcinoma squamoso

✓ 1.4.3 Carcinoma mucinoso

- ✓ 1.4.4 “Lipid-rich carcinoma”

1.5 Sarcoma

- ✓ 1.5.1 Fibrosarcoma
- ✓ 1.5.2 Osteosarcoma
- ✓ 1.5.3 Altri sarcomi

1.6 Carcinosarcoma

1.7 Carcinoma o sarcoma in tumori benigni

➤ Formazioni neoplastiche benigne:

2.1 Adenoma

- ✓ 2.1.1 Adenoma semplice
- ✓ 2.1.2 Adenoma complesso
- ✓ 2.1.3 Adenoma basaloide

2.2 Fibroadenoma

- ✓ 2.2.1 Fibroadenoma a bassa cellularità
- ✓ 2.2.2 Fibroadenoma ad alta cellularità

2.3 Tumore benigno misto

2.4 Papilloma duttale

➤ Formazioni neoplastiche non classificate

➤ Formazioni non neoplastiche:

3.1 Iperplasia duttale

3.2 Iperplasia lobulare

- ✓ 3.2.1 Iperplasia epiteliale
- ✓ 3.2.2 Adenosi

3.3 Cisti

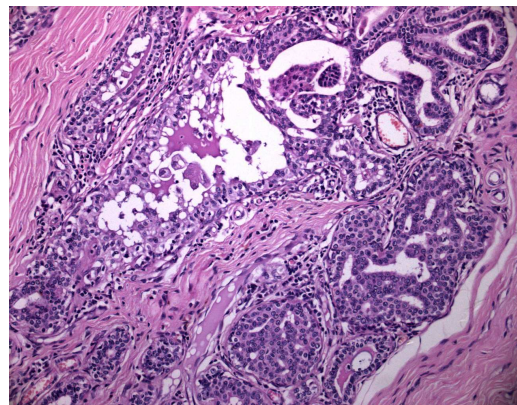
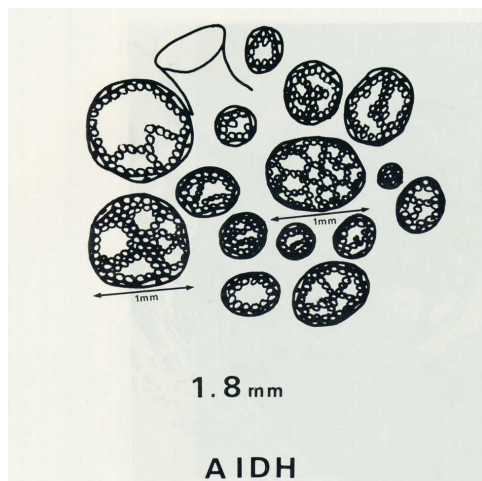
3.4 Ectasie duttali

3.5 Fibrosi focale (fibrosclerosi)

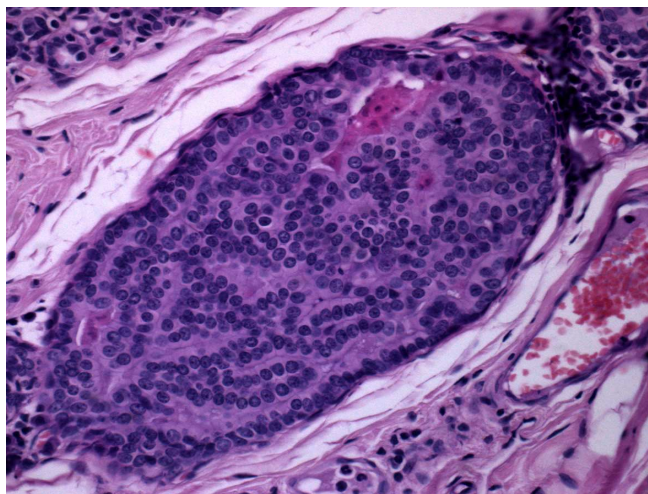
3.6. Ginecomastia

1.1 CARCINOMA NON INFILTRANTE IN SITU

In questo istotipo le cellule neoplastiche non superano la membrana basale delle strutture alveolari. Possono essere lesioni multicentriche, che prendono origine sia da dotti sia da lobuli, e possono avere aspetti diversi: cribriforme, comedonico e “clinging”. Spesso è difficile differenziare queste forme da forme di iperplasia duttale (epiteliosi) atipica.



Differenza tra AIDH e “carcinoma in situ”

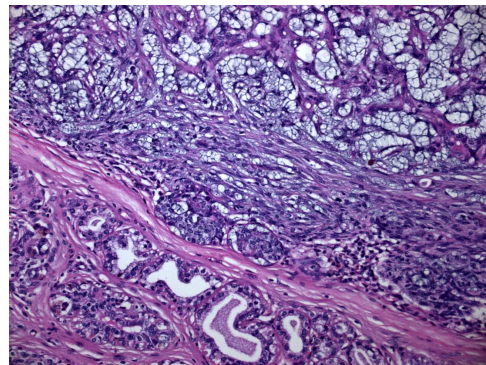


“Carcinoma in situ”

1.2 CARCINOMA COMPLESSO

E' una neoplasia comune nel cane; macroscopicamente ha un aspetto lobulato ed è composta sia da cellule epiteliali sia mioepiteliali. Le prime possono disporsi a formare neoplasie papillari, tubulari e tubulopapillari, le mioepiteliali invece, hanno un aspetto fusato o stellato e formano dei reticoli immerse in una matrice mucoide. Queste neoplasie si espandono nel tessuto connettivo circostante, ma solo il 10% invade i vasi linfatici e le metastasi sono rare, con sopravvivenza media intorno ai 10-12 mesi. (Marconato e Del Piero, 2005).

E' difficile differenziare queste forme da adenomi complessi. I criteri che possono aiutare nella diagnosi sono l'assenza di una capsula, la crescita infiltrativa, l'alta cellularità, la presenza di necrosi e l'alto indice mitotico.



Cane carcinoma mammario complesso

1.3 CARCINOMA SEMPLICE

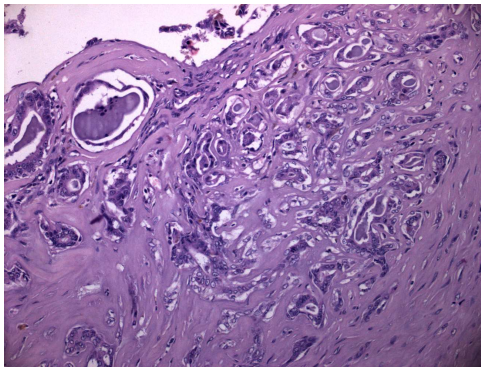
Tale neoplasia è composta di un solo tipo cellulare: epiteliale o mioepiteliale; prevale generalmente quella formata dal solo epitelio.

Sono tumori infiltranti lo stroma peritubulare e nel 50% dei casi invadono i vasi. L'aspetto iniziale dell'invasività è l'infiltrazione delle membrane basali alveolari o tubulari e sconfina nello stroma intralobulare. Un altro aspetto della malignità è la carente formazione di membrane basali.

Si distinguono 3 aspetti istologici di carcinoma semplice: il carcinoma tubulopapillare, il carcinoma solido ed il carcinoma anaplastico, che sono considerati, nella progressione con cui sono elencati, come un esempio di graduazione crescente della malignità clinica. (Marcato, 2002)

1.3.1 Carcinoma semplice tubulopapillare

Queste neoplasie possono essere suddivise in forme tubulari (senza elementi papillari), e papillari (senza componenti tubulari). Nelle forme tubulari ci può essere una forte proliferazione dei fibroblasti dello stroma; il tipo papillare, nel quale la componente stromale è ridotta, è frequente nel cane. (Midsorp et al., 1999) L'attività mitotica varia da modesta ad elevata (Marcato, 2002). Esiste anche una forma cisto-papillare ritenuta meno aggressiva, che può essere difficile da differenziare dalle lesioni benigne. Nel cane sono stati riportati casi di metastasi inaspettate da neoplasie cistopapillari altamente differenziate (Midsorp et al., 1973).



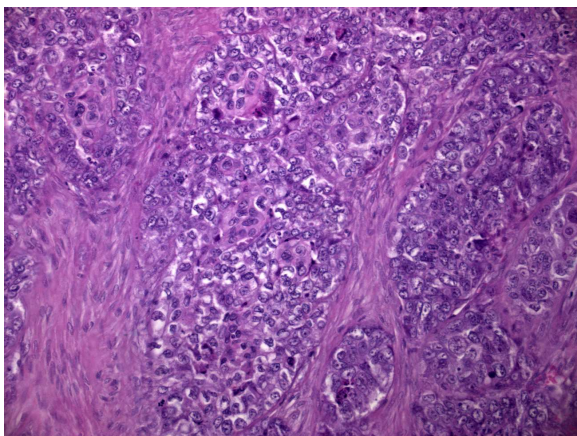
Cane carcinoma tubulopapillare semplice

1.3.2. Carcinoma semplice solido

Neoplasia comune nel cane e nel gatto; Il comportamento biologico è moderatamente aggressivo.

E' caratterizzato da cellule disposte in cordoni, ammassi solidi, strati compatti, senza evidenza di tubuli, alveoli o altri aspetti ghiandolari; la componente stromale varia da scarsa a moderata. In alcuni carcinomi solidi si trovano cellule con vacuoli citoplasmatici (Midsorp et al., 1999).

La necrosi e l'invasione dei linfatici è frequente e l'indice mitotico elevato.

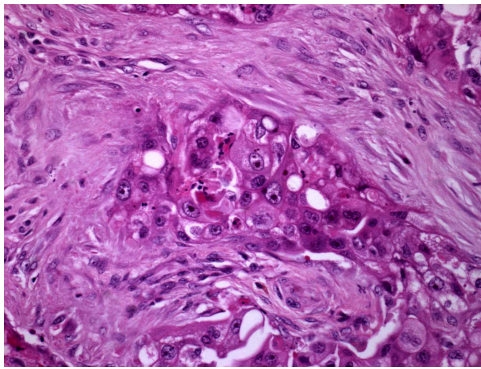


Cane carcinoma mammario semplice solido

1.3.3 Carcinoma semplice anaplastico

E' un carcinoma altamente infiltrante; l'aspetto istologico è quello di una neoplasia composta di cellule grandi, pleomorfe, con nuclei bizzarri con nucleoli prominenti. Possono essere presenti alcune cellule multinucleate; frequentemente si trova fibroplasia. Hanno un alta percentuale di recidive e metastasi, e la sola chirurgia non sembra essere curativa.

Può essere difficile differenziare questa forma di carcinoma dal sarcoma anaplastico.



Cane carcinoma mammario anaplastico

1.4 TIPI SPECIALI DI CARCINOMA

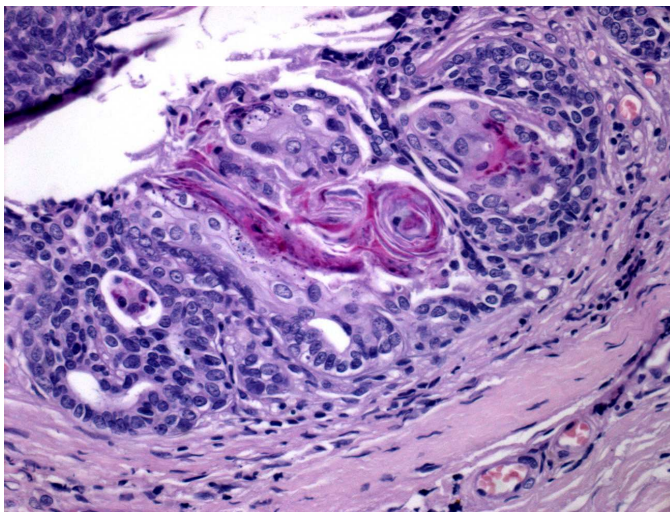
1.4.1 Carcinoma a cellule fusate

Sono in genere forme solide, in alcuni casi rimane ancora la formazione di tubuli. E' essenziale differenziare questi carcinomi dalle neoplasie mesenchimali, mediante indagini immunoistochimiche.

Alcune di queste neoplasie possono essere mioepiteliali: il mioepitelioma sembra essere più frequente nel gatto e segnalato raramente nel cane (Midsorp et al., 1999).

1.4.2 Carcinoma squamoso o squamocellulare.

Costituito da cellule basaloidi nella parte periferica delle travate di cellule neoplastiche, mentre nella porzione luminale si hanno aspetti di differenziazione squamosa. Sono neoplasie fortemente infiltranti e l'invasione dei linfatici è comune. Una variante del carcinoma squamoso è l'adenocarcinoma squamoso, che contiene anche strutture ghiandolari.



Cane carcinoma mammario squamoso

1.4.3 Carcinoma mucinoso

E' un tumore raro sia nel gatto sia nel cane; si ritrovano isole di cellule neoplastiche immerse in denso materiale mucoso, prodotto dalle cellule neoplastiche e che deve essere differenziato da focolai di metaplasia mucoide caratteristici delle neoplasie complesse.

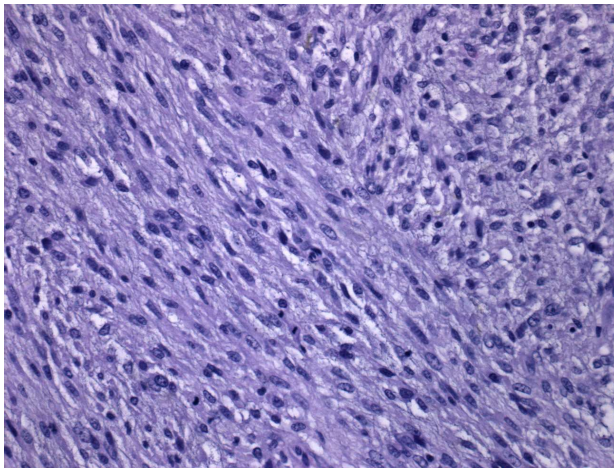
1.4.4 “Lipid rich carcinoma”

E' una neoplasia segnalata sporadicamente nel cane; è caratterizzata dalla presenza di cellule che nel citoplasma mostrano grossi vacuoli di grasso.

1.5 SARCOMA

1.5.1 Fibrosarcoma

E' una neoplasia mesenchimale comune nel cane, come l'osteosarcoma; è localmente infiltrante. E' costituita da uno stroma ricco di reticolina e fibre collagene. Fibrosarcomi necrotici ed emorragici possono essere difficili da distinguere da ascessi od emorragie capsulate, ma la valutazione delle zone periferiche ci può fornire una corretta diagnosi.



Cane fibrosarcoma mammario

1.5.2 Osteosarcoma

E' una neoplasia frequente nel cane; possono essere semplici o condro-osteosarcomi. Le cellule sono in genere molto anaplastiche con elevato indice mitotico; è frequente diffusione metastatica.

1.5.3 Altri sarcomi

Sono segnalati emangiomi, liposarcomi, condrosarcomi, emangiopericitomi.

1.6 CARCINOSARCOMA

E' segnalato raramente nel cane; è una neoplasia bifasica costituita da componente epiteliale maligna e dalla componente sarcomatosa. La maggior parte è ben circoscritta.

Come il carcinoma complesso, la sopravvivenza post-chirurgia è di un tempo relativamente lungo (Midsorp et al., 1973).

1.7 CARCINOMA O SARCOMA IN TUMORI BENIGNI

Sono segnalati sporadicamente nel cane; si tratta di neoplasie maligne che insorgono alla periferia di un tumore benigno, come ad esempio l'osteosarcoma che prenda origine da un tumore misto benigno.

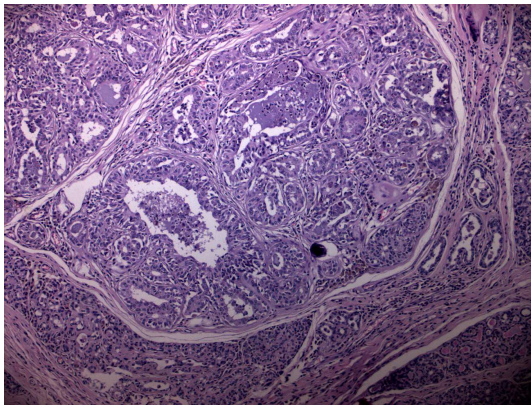
Non esistono sufficienti informazioni sulla prognosi di queste neoplasie.

2.1 ADENOMA

Si distinguono 3 tipi:

2.1.1. Adenoma semplice

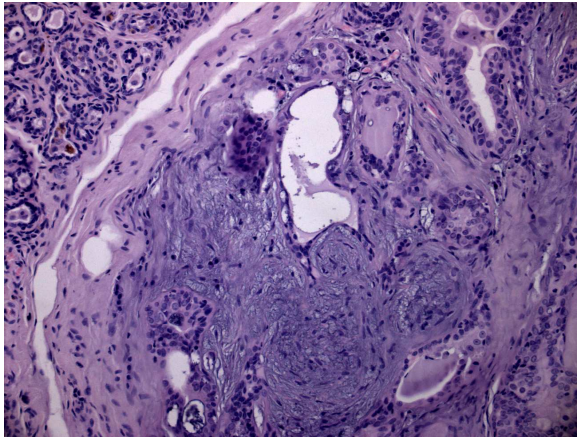
Lesioni rare nel cane. Si tratta di strutture tubulari non accompagnate da iperplasia e metaplasia delle cellule mioepiteliali; in alcuni casi è possibile attività secretoria. Lesioni solide costituite da cellule fusate possono essere mioepiteliomi benigni.



Cane adenoma semplice

2.1.2 Adenoma complesso

E' molto comune nella cagna; si tratta di strutture tubulari accompagnate da iperplasia e metaplasia delle cellule mioepiteliali, solitamente capsulate. Sono frequentemente associate a forme d'iperplasia lobulare o neoplasie miste benigne. Può essere difficile distinguere un adenoma complesso da un carcinoma complesso ben differenziato.



Cane adenoma complesso



Cane adenoma complesso

2.1.3 Adenoma basaloide

Si tratta di una neoplasia benigna, costituita da cordoni di cellule basaloide appoggiate su una sottile membrana basale. Possono esserci foci di metaplasia squamosa o ghiandolare. E' segnalato esclusivamente in cagne trattate con progestinici.

2.2 FIBROADENOMA

Può essere:

2.2.1 Fibroadenoma a bassa cellularità

E' segnalato con frequenza nelle donne giovani in gravidanza, ma solo raramente nel cane. E' una neoplasia benigna bifasica, in cui si ha una crescita duplice sia della componente stromale sia di quell'epiteliale.

In queste forme si osserva una ridotta componente epiteliale e mesenchimale.

2.2.2 Fibroadenoma ad alta cellularità.

Anch'essa è una forma benigna bifasica, però in questa forma sia la componente stromale che epiteliale mostrano una florida iperplasia.

2.3 TUMORE MISTO BENIGNO

Si tratta di una neoplasia benigna frequente nel cane; è costituita da strutture tubulo/alveolari accompagnate da cellule mioepiteliale associata a proliferazione e metaplasia della componente stromale.

Questa metaplasia può dare luogo a formazione di cartilagine e tessuto osseo.

2.4 PAPILLOMA DUTTALE

3.1 IPERPLASIA DUTTALE

Si tratta di una lesione non neoplastica, in cui si osserva una proliferazione dell'epitelio duttale che può portare ad un'occlusione parziale o totale del lume duttale. Si presenta in forma diffusa o multifocale “papillomatosi” o “epiteliosi”.

Spesso è difficile distinguerla da carcinomi intraduttali, specialmente “in situ”.

3.2 IPERPLASIA LOBULARE

Ne esistono due tipi:

3.2.1 Iperplasia epiteliale.

E' una lesione non neoplastica caratterizzata dalla proliferazione delle cellule epiteliali nei dotti intralobulari.

3.2.2 Adenosi

E' una proliferazione non neoplastica delle strutture tubulo/alveolari che aumentano marcatamente in numero; se si accompagna a proliferazione del connettivo perilobulare si hanno le forme di adenosi sclerosante.

Non deve essere confusa con carcinomi localmente infiltranti.

3.3 CISTI

3.4 ECTASIE DUTTALI

3.5 FIBROSI FOCAL (FIBROSCLEROSI)

3.6 GINECOMASTIA

CARCINOMA INFIAMMATORIO

Si tratta di una particolare variante di tumore mammario, identificabile per il caratteristico aspetto clinico e per la forte aggressività. Possono presentarsi con istotipi diversi, sia tubulari sia solidi. La neoplasia è segnata con una relativa frequenza nel cane 17% di tutti i tumori mammari (Perez-Alenza, 2001), mentre è molto rara nella gatta, dove esiste un'unica segnalazione (Perez-Alenza, 2004). Dal punto di vista clinico, queste neoplasie sono molto aggressive e diffondono rapidamente verso le altre mammelle, anche di entrambe le file. Si presenta come massa scarsamente circoscritta, eritematosa e dolente alla palpazione. All'ispezione si notano spesso piccoli noduli cutanei sparsi che rappresentano una metastatizzazione diretta. Le metastasi a distanza sono presenti nel 100% dei casi. Si assiste spesso ad ingorgo tumorale nei vasi linfatici dermici con metastatizzazione retrograda al popliteo e edema dell'arto corrispondente (Romanelli, 2007).

In uno studio effettuato su 21 casi di carcinoma infiammatorio, furono riscontrati tutti negativi alla presenza di recettori per estrogeni (Pena et al., 2003).

CAPITOLO 4

FATTORI

PROGNOSTICI

FATTORI PROGNOSTICI

La valutazione di un'accurata prognosi nei tumori mammari è complessa e multifattoriale:

- **L'età del soggetto al momento dell'insorgenza:** soggetti giovani sembrano avere prognosi peggiore (Romanelli, 2007; Sorenmo, 2003)
- **Il sesso:** sembra che nel maschio la prognosi sia sempre riservata (Romanelli, 2007).
- **La razza:** il Pastore Tedesco ha una prognosi peggiore. Il fatto che determinate razze presentino un'incidenza maggiore di tumori mammari suggerisce che ci sia una componente genetica (Romanelli, 2007).
- **Alterazioni molecolari, come la mutazione del gene p53 e l'overespressione di HER2 (c-erbB2):** queste sembra siano associate ad una prognosi peggiore, sia in studi di medicina umana che di medicina veterinaria; ci sono risultati discordanti in proposito, ma sembra che ci sia un aumento del rischio di recidive e di morte in associazione con mutazioni del p53. Tale gene è un “guardiano” della crescita cellulare, la cui perdita comporta l'inizio della cancerogenesi, proprio per alterata regolazione del ciclo cellulare. P53 è un gene frequentemente mutato nelle cellule tumorali umane (Marconato e Del Piero, 2005).

In donne con tumore mammario l'overespressione di HER2 è stata associata anche a resistenza alla terapia endocrina e ad un tempo minore di espressione di recidive; esiste però la possibilità di terapia specifica. Anche nel cane l'overespressione di HER2 è comune, e la maggior parte di tumori maligni sovraesprime tale oncogene, ma non

c'è correlazione tra l'espressione e l'invasione locale o metastasi (Sorenmo, 2003).

- **Il peso:** l'obesità giovanile sembra comportare un aumento del rischio (Perez-Alenza et al., 1998).
- **Alimentazione:** la dieta casalinga sembra essere collegata ad un maggior rischio rispetto a quella commerciale, forse per un maggior contenuto di grassi (Perez-Alenza et al., 1998).
- **La dimensione del nodulo:** la dimensione è una delle varianti prognostiche più importanti. E' fondamentale quindi una terapia precoce. Tumori con diametro > di 5 cm hanno prognosi peggiore (Romanelli, 2007).

Dimensione	Sopravvivenza post-chirurgica	Recidiva
$\varnothing > 3 \text{ cm}$	6-12 mesi	> 70 %
$2 < \varnothing < 3 \text{ cm}$	2 anni	20-70 %
$\varnothing < 2 \text{ cm}$	3 anni	< 20 %

(Fossum, 2003; Marconato e Del Piero, 2005)

- **L'aderenza ai piani sottostanti:** è un fattore prognostico negativo poiché suggerisce un'interessamento dei piani e quindi una maggior invasività tumorale.
- **Noduli singoli o multipli:** tumori multipli non implicano necessariamente una prognosi peggiore (Sorenmo, 2003).
- **Lo stato della cute:** l'ulcerazione cutanea ed aree di necrosi della massa neoplastica si accompagna ad una maggiore malignità.

- **Il tempo d'insorgenza:** tumori maligni che sono presenti da più di 6 mesi hanno prognosi peggiore rispetto a quelli presenti da meno di 6 mesi (Romanelli, 2007).
- **Ovariectomia:** se effettuata in età adulta non nei due anni precedenti al tumore è un fattore prognostico negativo; uno studio riporta una maggior sopravvivenza in soggetti ovaristerectomizzati entro 2 anni prima della comparsa della neoplasia o al momento della mastectomia, rispetto che in cagne che rimangono intere o vengono castrate prima dei 2 anni antecedenti al tumore (Sorenmo et al., 2000).
- **L'attività dei recettori ormonali:** i recettori per gli estrogeni e per il progesterone sono fisiologicamente presenti sia a livello della mammella normale che neoplastica; è interessante notare che l'espressione dei recettori ormonali, tipica delle cellule mammarie mature, diminuisce od è addirittura assente nei tumori indifferenziati o nelle lesioni metastatiche. In medicina umana la valutazione dello stato dei recettori rappresenta un parametro d'importanza clinica ai fini terapeutici e prognostici, ma in medicina veterinaria detta valutazione non è effettuata di routine, sebbene si sia visto che il profilo dei recettori per gli estrogeni (ER) e per il progesterone (PR) potrebbe avere implicazioni prognostiche simili a quelle per la donna. Nella cagna, la maggior parte dei tumori mammari benigni o ben differenziati è ER+ (60-77% circa) e PR+, mentre quelli maligni sono tendenzialmente ER- (40-60 %).

Numerosi fattori influenzano lo stato dei recettori. Innanzitutto la dimensione del tumore primitivo si associa a differente espressione recettoriale: infatti, la concentrazione di ER e PR tende a diminuire con l'aumentare del volume della neoplasia. Anche lo stato ormonale della cagna influenza l'espressione recettoriale: le cagne in fase luteale

hanno più alta concentrazione di ER, rispetto alle cagne ovariectomizzate o in anestro. Solamente cani con neoplasia ER+ traggono beneficio dall'ovariectomia e dalla terapia ormonale: pertanto la positività ai recettori per gli estrogeni ha significato prognostico favorevole, sia in termini di tasso di recidiva sia di sopravvivenza.

Fino a qualche anno fa la valutazione dello stato dei recettori era una tecnica indaginosa; attualmente la determinazione immunoistochimica dei recettori ha semplificato notevolmente la procedura.

- **Stadiazione clinica TNM:** la prognosi peggiora dal I al IV stadio. Cani che hanno interessamento linfonodale (IV stadio) hanno un'aspettativa di sopravvivenza inferiore rispetto a soggetti con assenza di metastasi linfonodali; cani che hanno metastasi a distanza (V stadio), hanno prognosi peggiore di cani in cui non si riscontrano metastasi o che hanno metastasi unicamente al linfonodo regionale (Sorenmo, 2003).

- **Invasione linfonodale:** è il più importante dei fattori prognostici. In diversi studi si è riscontrato l'interessamento linfonodale comporta una prognosi peggiore; l'80% dei cani con interessamento linfonodale presentano recidive entro i 6 mesi (Gilbertson et al., 1983; Kurzman et al., 1986; Yamagami et al., 1996) mentre soggetti con carcinoma con linfonodi negativi sono soggetti a recidive nel 30% dei casi o meno nei 2 anni post-chirurgia. Karayannapoulou e colleghi condividono l'ipotesi: durante un follow-up di 2 anni in cui ha seguito 66 soggetti, l'86% di quelli con interessamento linfonodale sono morti, contro il 21% di quelli con linfonodi negativi.

• **Grado di invasività neoplastica** (Gilbertson et al, 1983) o **stadiazione istologica** (Marconato e Del Piero, 2005); è una classificazione che suddivide i carcinomi in 4 gradi istologici:

- ✓ Grado istologico 0: “carcinoma in situ”; le cellule neoplastiche non hanno sfondato la lamina basale. E’ una lesione non infiltrante.
- ✓ Grado istologico I: proliferazione maligna estesa allo stroma senza invasione linfatica o vascolare.
- ✓ Grado istologico II: lesioni con invasione linfatica e/o vascolare e/o metastasi ai linfonodi regionali.
- ✓ Grado istologico III: proliferazione maligna con invasione linfatica-vascolare e metastasi a distanza.

Secondo la stadiazione istologica è possibile prevedere il comportamento biologico del tumore e impostare la terapia più efficace.

• **Classificazione basata su grading istologico (Elston Ellis 1991):** in questa classificazione il grado di un tumore è determinato dalla valutazione di tre diversi parametri. Questi sono la formazione di tubuli, il pleomorfismo nucleare e cellulare e l’indice mitotico, valutato come il numero totale di mitosi in 10 campi microscopici ad elevato ingrandimento (400X).

A ciascun parametro viene attribuito un punteggio da 1 a 3.

- ✓ formazioni tubulari:
 - elevate (>75%) : 1
 - moderate (10-75%) : 2
 - poche o assenti (<10%) :3
- ✓ pleomorfismo cellulare e nucleare:
 - cellule e nuclei piccoli e regolari: 1
 - lieve pleomorfismo cellulare: 2

- elevato pleomorfismo cellulare: 3
- ✓ indice mitotico:
- 0-5 mitosi per campo: 1
- 6-10 mitosi per campo: 2
- >11 mitosi per campo: 3

Il punteggio totale ci dà la classificazione del carcinoma in :

- ✓ Grado I (da 3 a 5 punti): tumore ben differenziato (WDC, well differentiated carcinoma).
- ✓ Grado II (6 o 7 punti): tumore moderatamente differenziato (MDC, moderately differentiated carcinoma).
- ✓ Grado III (8 o 9 punti): tumore scarsamente differenziato (PDC, poorly differentiated carcinoma).

- **Reazione cellulare linfoide nel tessuto circostante il tumore:** è un altro fattore che è stato correlato con la prognosi; l'attività linfoide cellulare nei pressi della neoplasia è indicativa di una risposta immunitaria antitumorale. E' stato condotto uno studio sulla presenza o assenza di reattività linfocellulare in cani con tumore mammario al momento dell'intervento di mastectomia: quelli che presentavano attività linfocellulare hanno un rischio minore di sviluppare recidive entro i 2 anni piuttosto che quelli che non avevano tale attività (Gilbertson et al., 1983). In questo studio, cani con tumori istologicamente di I grado che presentano reattività linfocellulare hanno recidive entro 2 anni nel 45% dei casi, mentre soggetti senza tale reattività le presentano nel 83% dei casi.

- **Presenza di metastasi a distanza al momento della diagnosi:** in uno studio, la media di sopravvivenza post-chirurgia è di 5 mesi in soggetti con metastasi, contro i 28 mesi in soggetti che non ne presentano (Withrow e Vail, 2007).

- **Istotipo:** La classificazione WHO è utile anche ai fini prognostici; sembra che classifichi i carcinomi in ordine di malignità crescente secondo la scala successiva riportata:

adenoma → carcinoma complesso → carcinoma semplice → sarcoma → carcinosarcomi.

Nell'ambito dei carcinomi semplici, la maggior malignità procede secondo la scala:

“carcinoma in situ” → carcinoma tubulopapillare → carcinoma solido → carcinoma anaplastico.

La prognosi peggiora parallelamente ad una perdita di differenziazione; “carcinoma in situ” e adenocarcinomi hanno una prognosi migliore rispetto a carcinomi anaplastici ed infiammatori.

Soggetti con neoplasie maligne hanno un'aspettativa di vita inferiore rispetto a quelli con neoplasie benigne; la sopravvivenza oltre i 2 anni è stata riportata nel 25-40% dei casi, con un range tra i 4 e i 17 mesi, ma questo tempo è influenzato da diversi fattori, come il tipo istologico, la differenziazione della neoplasia, lo stadio della malattia ed i trattamenti effettuati (Sorenmo, 2003; Marconato e Del Piero, 2005).

Diversi studi condotti in seguito ad altri effettuati in medicina umana, hanno dimostrato che la presenza di tumori benigni aumenta il rischio dello sviluppo di tumori maligni (Gilbertson et al., 1983)

- **Espressione di fattori angiogenetici (VEGF):** la neoangiogenesi si associa ad un fenotipo maligno e alla comparsa precoce di metastasi; la densità dei vasi a livello tumorale e la positività al fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) riflettono l'attività angiogenica del tumore e tendono ad aumentare nelle neoplasie

maligne e poco differenziate. E' quindi un fattore prognostico negativo (Marconato e Del Piero, 2005).

- **Espressione della ciclossigenasi-2 (COX-2):** Come in patologia umana, nella ghiandola mammaria sana del cane non c'è espressione della COX-2, che invece è presente nel tessuto neoplastico con una percentuale media del 24% in tumori benigni e del 56% in tumori maligni, in misura crescente con il grado di malignità (Dore et al., 2003)

In uno studio effettuato da Millanta sul ruolo del COX-2 come indicatore prognostico nei tumori mammari maligni del cane, è stato riscontrato che tale enzima non si trova nei tessuti sani, mentre si osserva nel 100% dei carcinomi invasivi (Millanta et al., 2006).

CAPITOLO 5

MATERIALI E

METODI

MATERIALI E METODI

Per questo studio abbiamo preso in considerazione una popolazione di 63 cagne, che sono pervenute al dipartimento di clinica veterinaria università di Pisa San Piero a Grado in quanto affette da neoplasia mammaria.

Alcuni di questi soggetti sono stati seguiti mediante un follow-up retrospettivo basandoci su dati presenti in cartella clinica, altri ho avuto modo di monitorarli personalmente.

In entrambi i casi le caratteristiche dello studio sono le stesse.

Criteri di inclusione nella popolazione:

- ✓ Buone condizioni generali del soggetto
- ✓ Presenza di lesioni neoplastiche.
- ✓ Accertamento di assenza di metastasi in seguito ad indagini diagnostiche (radiografia al torace e ecografia addominale).
- ✓ Intervento di mastectomia.
- ✓ Esame istopatologico sulla/e neoplasia/e asportate.

Per i soggetti mastectomizzati che erano risultati affetti da carcinoma, è stato attuato un follow-up accurato di 720 giorni:

- ✓ Se il soggetto è stato seguito personalmente nel dipartimento della clinica veterinaria di San Piero a Grado, i controlli sono stati effettuati ogni 6 mesi. I soggetti sono stati sottoposti ad una visita clinica completa, ad un ispezione della sede di mastectomia e dei linfonodi se non asportati, 2 proiezioni di lastre al torace ed ecoaddome.

- ✓ Per i cani che fanno parte dello studio retrospettivo le informazioni ci sono state fornite dal proprietario e da annotazioni nella cartella clinica.

Sono stati esclusi dal nostro studio quei soggetti per cui non è stato possibile effettuare un follow-up preciso ed affidabile.

Di seguito sono riportate le razze che entrano a far parte della popolazione, frequenza per ognuna di esse e la percentuale di ogni razza sul totale dei soggetti.

RAZZA	NUMERO SOGGETTI	%
Barboncino	4	0,063
Bassotto	1	0,016
Beagle	2	0,032
Bolognese	2	0,032
Boxer	8	0,127
Bracco italiano	2	0,032
Bracco tedesco	2	0,032
Breton	1	0,016
Cirneco dell'etna	2	0,032
Cocker spaniel	1	0,016
Corso	1	0,016
Dalmata	1	0,016
Dobermann	5	0,079
Kursar	1	0,016
Labrador	3	0,048

Meticcio	16	0,254
Parson jack russel	1	0,016
Pastore maremmano	1	0,016
Pastore tedesco	7	0,111
Setter inglese	2	0,032
TOTALE:	63	1

Nella nostra popolazione l'età media dei soggetti al momento dell'identificazione della neoplasia era = 9,3+/- 2,0 (range 5-14 anni).

Ogni soggetto che è entrato a far parte della nostra popolazione, è stato antecedentemente sottoposto al medesimo iter diagnostico e terapeutico:

- Visita clinica completa da cui risulta la presenza evidente di lesioni neoplastiche mammarie.
- Indagini diagnostiche per immagine per escludere la presenza di metastasi sistemiche (stadio istologico III); sono state effettuate:
 - ✓ 3 proiezioni di radiografie: 2 LL e una VD/DV.
 - ✓ ecoaddome.
- FNA del/ dei noduli .
- intervento di mastectomia più indicato per la localizzazione e le dimensioni della neoplasia/e.
- esame istopatologico sulla/e neoplasia/e asportata/e.

MATERIALI E METODI PER LA CHIRURGIA

Strumenti necessari per eseguire un intervento di mastectomia:

➤ *Trousse chirurgica* adeguata per le dimensioni del paziente contenente:

- ✓ strumenti per la delimitazione del campo operatorio: pinze fissateli o Backhaus
- ✓ Strumenti per la dieresi dei tessuti molli:
 - a. Manici di bisturi a testa piccola (n.3) o grande (n.4) su cui sono montate lame sterili monouso (19-22 mm).
 - b. Forbici a punta acuta-smussa, da dissezione (Metzenbaum, Mayo), da sutura.
- ✓ Pinze tissutali:
 - a. Anatomiche: con punte zigrinate atraumatiche per la presa di tessuti più delicati.
 - b. Chirurgiche: con punte dotate di “denti di topo”, che assicurano una solida presa dei tessuti, ma sono più traumatiche delle anatomiche.
- ✓ Pinze emostatiche: attuano uno schiacciamento dei tessuti e sono utilizzate per occludere i vasi ematici. Ne esistono di diverse forme e dimensioni.
- ✓ Porta aghi: si utilizzano per afferrare e manipolare gli aghi curvi. I modelli più utilizzati nella mastectomia sono il Mayo-Hegar e Olsen-Hegar; quest’ultimo ha in più una parte delle branche che può essere utilizzata come forbice per tagliare i fili da sutura.

➤ **Strumenti per l'elettrocoagulazione:** per l'esecuzione dell'emostasi una tecnica ampiamente utilizzata è quella dell'elettrocoagulazione; tale tecnica è impiegata solitamente per i vasi con diametro inferiore a 1,5 o 2 mm, mentre i vasi più grossi dovrebbero essere legati. Ne esistono di due tipi:

- ✓ elettrocoagulatore monopolare.
- ✓ elettrocoagulatore bipolare: è quello più utilizzato negli interventi di mastectomia perché dotato di maggior precisione.

➤ **Fili di sutura** riassorbibili e non riassorbibili.

Tecnica chirurgica

➤ **Nodulectomia:** in seguito a preparazione adeguata del campo operatorio, si effettua un'incisione ellittica a circoscrivere il tumore di cute, sottocute e fascia esterna della mammella; successivamente si produce per via smussa un piano di scollamento artificiale entro il tessuto mammario sano e si asporta il tumore e la porzione di mammella apparentemente sana che lo circonda.

Controllata l'emorragia con elettrocoagulatore bipolare, pratichiamo una sutura continua semplice in materiale riassorbibile che comprenda il sottocute e la fascia esterna della mammella adiacente per ridurre la tensione della sutura cutanea.

Infine, la cute è suturata con una sutura continua "a materassoio orizzontale" in materiale non riassorbibile (nylon).

➤ **Mastectomia semplice, mastectomia regionale e mastectomia totale monolaterale:** la tecnica base per questi 3 interventi chirurgici è la stessa. In seguito a preparazione adeguata del campo operatorio, si

esegue un'incisione ellittica di cute, sottocute e fascia superficiale della mammella a circoscrivere le ghiandole mammarie che devono essere asportate; l'incisione deve essere praticata ad almeno 1 cm di distanza dal tumore (Fossum, 2002).

Il sanguinamento superficiale è controllato mediante elettrocoagulazione bipolare e se necessario con l'allacciatura dei vasi. Dal margine esterno dell'incisione cutanea si procede con la dissezione della fascia superficiale della mammella e con essa del tessuto mammario dal tessuto sottocutaneo adiacente, utilizzando forbici Metzenbaum o Mayo.

Procedendo quindi cranio-caudalmente si pratica, nelle mastectomie regionali e totali, l'escissione in blocco delle mammelle interessate; si eleva l'estremità craniale del segmento cutaneo inciso e si fa trazione per rendere la dissezione dei tessuti più agevole.

Trovato il giusto piano di scollamento (che si trova tra la fascia profonda della mammella e la guaina dei muscoli sottostanti), si prosegue con un movimento di scorrimento delle forbici fino all'asportazione del segmento cutaneo, delle mammelle connesse e della fascia profonda della mammella.

Durante la dissezione delle mammelle toraciche e addominali, si deve isolare per via smussa i rami perforanti dell'arteria toracica interna (cranialmente), i vasi epigastrici craniali superficiali (medialmente) e l'arteria toracica esterna (lateralmente), e successivamente devono essere allacciati con fili da sutura monofilamento riassorbibili ed infine recisi.

Il linfonodo ascellare è compreso nell'escissione "in blocco" delle mammelle toraciche solo se aumentato di volume o positivo alla citologia.

Durante l'asportazione delle ghiandole inguinali si deve isolare ed allacciare mediante medesima tecnica sopradescritta i vasi pudendi esterni (che fuoriescono dal canale inguinale) e i rami labiali ventrali dell'arteria e vena pudende esterne.

Contrariamente al linfonodo ascellare, quello inguinale superficiale è sempre asportato associato al tessuto mammario.

Per ridurre lo spazio morto che si crea, si avvicina il tessuto sottocutaneo con una sutura continua semplice in polifilamento riassorbibile; successivamente si sutura la cute con una sutura continua a materassaio orizzontale in materiale non riassorbibile (nylon).

MATERIALI E METODI PER L'ESAME ISTOPATOLOGICO

- ✓ contenitore di plastica di dimensioni adeguate al pezzo
- ✓ formalina
- ✓ alcool
- ✓ pinze chirurgiche
- ✓ lama del microtomo
- ✓ cappa aspirante
- ✓ processatore
- ✓ inclusore
- ✓ microtomo
- ✓ set per la colorazione dei vetrini

Il materiale prelevato viene posto in un contenitore con formalina in un rapporto minimo di 1:10, in cui deve stare indicativamente 48 ore in relazione alle dimensioni del campione, che

deve risultare sufficientemente fissato. Tale contenitore, insieme ad una descrizione sommaria del caso, viene inviato al patologo, che eseguirà in prima persona la scelta del pezzo significativo.

Il patologo, dopo aver valutato la fissazione del campione, ne effettua la riduzione. Importante in questo passaggio, se richiesto e possibile, riuscire a prelevare con margini il campione ridotto.

Successivamente il materiale viene posto in una confezione apposita su cui viene apposto il numero identificativo del pezzo. Segue:

✓ Fase di disidratazione del campione: quest'ultimo viene immerso in un contenitore con alcool a 80% in cui resta dalle 12 alle 24 ore.

✓ Fase di processazione: il campione passa attraverso il *processatore*. All'interno di tale macchinario si trovano vasche in cui il pezzo deve passare in sequenza:

- a. 3 vasche con alcool al 90%, in cui sta per 1 ora e mezzo nella prima e nella seconda, e due ore nella terza.
- b. 3 vasche con alcool assoluto, in cui aspetta 1 ora e mezzo nella prima e nella seconda, e due ore nella terza.
- c. 2 vasche con xiloli, in cui riposa 2 ore ciascuna.
- d. 2 vasche di acciaio contenenti paraffina al punto di fusione (58°C) in cui resta due ore ciascuna.

✓ Fase di inclusione del blocchetto in paraffina: si effettua grazie all'*inclusore*.

✓ Fase del taglio e della preparazione del vetrino: si effettua una sezione del blocchetto di 3-4 micron di spessore tramite il *microtomo*. Successivamente si stende la sezione su di un *vetrino portaoggetto* e si lascia asciugare in una stufa apposita a 37°C fino a che non aderisce completamente.

- ✓ Fase di idratazione del vetrino: passaggi in sequenza di 3 minuti ciascuno in 1 vasca con xilolo, 1 con alcol puro, 1 con alcol 95%, 1 con alcol 80%, e successivamente in una vaschetta con acqua di fonte.
- ✓ Fase di colorazione del vetrino:
 - a. Ematossilina per 4 minuti
 - b. lavaggio in acqua corrente per 10 minuti.
 - c. Eritrosina
- ✓ Fase di disidratazione del vetrino: passaggi in sequenza di 3 minuti ciascuno in 1 vasca in alcool 80%, 1 con alcool 90%, 1 con alcool puro ed 1 con xilolo.
- ✓ Infine si incolla al vetrino un vetrino coprioggetto e si lascia asciugare per circa mezz'ora.

La lettura e la valutazione del vetrino viene effettuata utilizzando diverse classificazioni:

➤ Elston-Ellis: classifica le neoplasie in gradi valutandone la formazione di tubuli, il pleomorfismo nucleare e cellulare e l'indice mitotico, valutato come il numero totale di mitosi in 10 campi microscopici ad elevato ingrandimento (400X).

A ciascun parametro viene attribuito un punteggio da 1 a 3.

- ✓ formazioni tubulari:
 - elevate (>75%) : 1
 - moderate (10-75%) : 2
 - poche o assenti (<10%) :3
- ✓ pleomorfismo cellulare e nucleare:
 - cellule e nuclei piccoli e regolari: 1
 - lieve pleomorfismo cellulare: 2
 - elevato pleomorfismo cellulare: 3
- ✓ indice mitotico:

- 0-5 mitosi per campo: 1
- 6-10 mitosi per campo: 2
- > 11 mitosi per campo: 3

Il punteggio totale ci dà la classificazione del carcinoma in :

- ✓ Grado I (da 3 a 5 punti):tumore ben differenziato (WDC, well differentiated carcinoma).
- ✓ Grado II (6 o 7 punti): tumore moderatamente differenziato (MDC, moderately differentiated carcinoma).
- ✓ Grado III (8 o 9 punti): tumore scarsamente differenziato.(PDC, poorly differentiated carcinoma).

➤ Istotipo secondo la classificazione WHO

➤ Stadiazione istologica: come detto, è una classificazione che suddivide i carcinomi in 4 gradi istologici:

- ✓ Grado istologico 0: carcinoma in situ; le cellule neoplastiche non hanno sfondato la lamina basale. E' una lesione non infiltrante.
- ✓ Grado istologico I: proliferazione maligna estesa allo stroma senza invasione linfatica o vascolare.
- ✓ Grado istologico II: lesioni con invasione linfatica e/o vascolare e/o metastasi ai linfonodi regionali.
- ✓ Grado istologico III: proliferazione maligna con invasione linfatica-vascolare e metastasi a distanza.

Dopo aver effettuato la diagnosi istologica,abbiamo calcolato tramite un programma informatico specifico (SPSS versione 13.0) la frequenza e le percentuali di:

- ✓ neoplasie maligne e benigne sul totale della popolazione.
- ✓ adenomi e iperplasie sul totale dei tumori benigni.
- ✓ carcinomi semplici, complessi e “tipi speciali” sul totale delle neoplasie maligne.
- ✓ “carcinomi in situ”, localmente infiltranti, invasivi linfatici e linfonodo sul totale dei carcinomi.
- ✓ carcinomi scarsamente differenziati, mediamente e ben differenziati sul totale dei carcinomi.
- ✓ carcinomi tubulari, solidi e anaplastici sul totale dei carcinomi semplici.

Per i soggetti affetti da carcinoma è stato attuato un follow-up di 720 giorni; durante questo periodo abbiamo preso nota, attraverso controlli periodici a 6, 12, 18 e 24 mesi post-chirurgia per i soggetti che ho controllato personalmente, e attraverso informazioni tratte dalla cartella clinica e da referti e informazioni forniteci dai proprietari nel caso dello studio retrospettivo, di:

- eventuale morte del soggetto, cioè di quanti soggetti erano ancora vivi al termine del nostro follow-up, quanti erano morti per causa diversa dal tumore mammario e quanti invece erano deceduti per cause legate al tumore mammario,
- se sono insorte recidive e dopo quanto tempo.
- se ci sono state nuove neoplasie, intendendo per nuova neoplasia un tumore mammario non localizzato dove precedentemente asportato.
- se si sono riscontrate metastasi e dopo quanto tempo.

Dopo aver raccolto tutti i dati, abbiamo calcolato con il programma SPSS le frequenze e le percentuali di:

- ✓ presenza/assenza di metastasi sul totale dei soggetti che erano affetti da carcinoma.
- ✓ presenza/assenza di nuova neoplasia sul totale dei soggetti che erano affetti da carcinoma,
- ✓ presenza/assenza di recidive sul totale dei soggetti che erano affetti da carcinoma,
- ✓ soggetti morti per cause legate al tumore mammario, per cause diverse e di soggetti vivi.

Successivamente, attraverso il test statistico del χ quadro, abbiamo valutato un'eventuale correlazione significativa tra la sopravvivenza del soggetto ed i parametri di seguito riportati, e ne abbiamo rappresentato i risultati mediante la funzione Kaplan-Meier, che esprime la curva di sopravvivenza in un follow-up di 720 giorni. Abbiamo escluso dallo studio i soggetti morti per causa diversa dal tumore mammario.

- ✓ Istotipo carcinoma semplice vs istotipo carcinoma complesso
- ✓ Istotipo carcinoma semplice tubulare vs istotipo carcinoma semplice solido + anaplastico. In questo caso abbiamo raggruppato in un'unica classe due istotipi perché davano risultati simili.
- ✓ Grado istologico 0 vs grado istologico 1 vs grado istologico 2.
- ✓ Grado di Elston Ellis MDC + WDC vs PDC Anche in questo caso abbiamo unito MDC e WDC per il medesimo motivo (vedi sopra.)
- ✓ Indice mitotico inferiore o uguale alla mediana (4 mitosi/HpF) o superiore alla mediana (4 mitosi/HpF).

Infine abbiamo messo in correlazione ognuno dei precedenti fattori rispettivamente con l'“evento metastasi”, l'“evento recidiva” e l'“evento nuova neoplasia”, e abbiamo valutato la significatività di tale associazione, sempre utilizzando il test statistico del χ quadro. ($p < 0,05$).

BIBLIOGRAFIA

- ✓ Bonfanti U. Citologia. In: Romanelli G, Oncologia del cane e del gatto, Ed elsevier masson, pp 11-19, 2007.
- ✓ Chang SC, Chang CC, Chang TJ, Wong ML. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dog with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). J Am Vet Med Assoc. 15: 1625-9, 2005.
- ✓ Doré M, Lanthier I, Sirois J. Cyclooxygenase-2 Expression in Canine Mammary Tumors. Vet Pathol. 40: 207-212, 2003.
- ✓ Egenvall A, Bonnett BN, Ohagen P et al. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. Prev Vet Med. 69: 109-127, 2005.
- ✓ Fossum TW. Small animal surgery, Mosby ed, 2002.
- ✓ Gilbertson SR, Kurzman ID, Zachrau RE, Hurvitz IA, Black MM. Canine Mammary Ephetelial Neoplasms: Biologic Implications of Morphologic Characteristics Assessed in 232 Dogs. Vet Pathol. 20: 127-142, 1983.
- ✓ Goldschmidt MH, Shofer FS, Smelstoys JA. Neoplastic lesions of the mammary gland. In: Mohr U, Pathobiology of the aging dogs , pp 168-178, 2001.

- ✓ Itoh T, Uchida K, Ishikawa K, Kushima K, Kushima E, Tamada H, Moritake T, Nakao H, Shii H. Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. *J Vet Med Sci.* 67: 345-7, 2005.

- ✓ Karayannapoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidic TC, Dessiris A. Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 48: 85-96, 2001.

- ✓ Karayannapoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidic TC, Dessiris A. Histological grading as prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *Comp Pathol.* 133: 246-52, 2005.

- ✓ Kurzman ID, Gilbertson SR, Prognostic factors in canine mammary tumors. *Semin Vet Med Surg.* 1:25-32, 1986.

- ✓ Lana ES, Rutteman GR, Withrow JS. Tumors of the Mammary Gland. In: Withrow JS, Vail MD, Withrow & Mac Ewen's Small Animal Clinical Oncology, 4nd ed Saunders, pp 219-236, 2007.

- ✓ Marcato PS, Sarli G. Ghiandole mammarie. In: Marcato PS. *Patologia sistematica veterinaria*, Edagricole, pp 1045-1903, 2002.

- ✓ Marconato L, Del Piero F. Tumori mammari nel cane. In: Marconato L, Del Piero F, *Oncologia medica dei piccoli animali*, Poletto editore, pp 440-459, 2005.

- ✓ Millanta F, Calandrella M, Bari G, et al. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Res Vet Sci.* 79: 225-232, 2005.

- ✓ Millanta F, Citi S, Della Santa D, Porciani M, Poli A. COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Research and Treatment.* 98: 115-235, 2006.

- ✓ Midsorp W, Cothin E, Hampe JF, Jabara AG, Von Sandersleben J. Canine malignant mammary tumors, III: special types of carcinomas, malignant mixed tumors. *Vet Pathol.* 10: 241-256, 1973.

- ✓ Misdorp W, Else R, Hellmén E, Lipscomb T. Histologic Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat. (World Health Organisation International Classification of Tumors of Domestic Animals, second series, vol. 7, no.2.) Armed Forces Institute of Pathology, Washington, 1999.

- ✓ Nickel R, Schummer A, Seiferle E. Trattato di anatomia degli animali domestici Casa editrice Ambrosiana, 1988.

- ✓ Owen LN. Classification of Tumors in Domestic Animals. World Health Organisation, Geneva, 1980.

- ✓ Pelagalli GV, Botte V. Anatomia veterinaria sistematica e comparata. Ed Ermes, 1999.

- ✓ Pena L, Perez-Alenza MD, Rodriguez-Bertos A, Nieto A. Canine infiammatori mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. *Breast Cancer Res Treat.* 78: 141-148, 2003

- ✓ Pérez-Alenza MD, Rutteman GR, Pena L, et al. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *J Vet Intern Med.* 12: 132-139, 1998.

- ✓ Philibert JC, Snyder PW, Glickman N, et al. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *J Vet Intern Med.* 17: 102-106, 2003.

- ✓ Romanelli G. Tumori mammari In: Romanelli G, *Oncologia del cane e del gatto*, Ed elsevier masson, pp 215-222, 2007

- ✓ Rutteman GR. Contraceptive steroids and the mammary gland: is there a hazard ? Insight from animal studies. *Breast Cancer Research and Treatment* 23, 29-41, 1992.

- ✓ Rutteman GR and Misdorp W Hormonal background of canine and feline mammary tumors. *Journal of Reproduction and Fertility.* Supplement 47: 483-487, 1993.

- ✓ Rutteman GR, Withrow SJ, Mac Ewen EG. Tumors of the mammary gland. In: Withrow SJ, Mac Ewen EG, *Small Animal Clinical Oncology*, 3rd ed Saunders, pp 455-477, 2001.

- ✓ Rutterman GR, Kirpensteijn J. Tumors of the mammary glands. In: Dobson JM, Lascelles BDX, Manual of Canine and Feline Oncology, 2nd ed, pp 234-242, 2003.
- ✓ Sorenmo KU, Shofer FS, Goldschmidt MH. Effects of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. J Vet Intern Med. 14: 266-270, 2000
- ✓ Sorenmo K, DVM. Canine mammary gland tumors. Vet Clin North Am Small Animal Pract. 33: 573-596, 2003.
- ✓ Suter PF, Lord PF. Radiographic differentiation of disseminated pulmonary parenchymal diseases in dogs and cats. Vet Clin North Am. 4: 687-710, 1974.
- ✓ Yamagami T, Kobayashi T, Takahashi K. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on the TNM and histologic classification. J vet Med Sci. 58: 1079-1083, 1996.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio innanzi tutto i miei genitori, perché è grazie al loro amore che ho potuto realizzare il primo progetto importante della mia vita.

Grazie ad Argo, per avermi regalato la mia strada al posto della sua.

E grazie ai miei nonni, per aver lasciato in me un po' di loro stessi; grazie in particolare a nonno Gino, che mi ha insegnato ad amare i cani.

Ed ovviamente ringrazio mio fratello Diego, per essermi sempre stato vicino in qualsiasi momento e per la certezza che mi dà che lo sarà sempre.

E con lui grazie alla mia seconda famiglia, Mavie, Franco, Sabri, per avermi sempre accolto e mantenuto a cucchiariate di Nutella!!

Ringrazio anche Dario, perché è merito suo se ho concluso questo percorso, e per avermi accompagnato in questi anni.

Grazie a Francesca, per tutte le serate alcoliche che abbiamo condiviso e che per fortuna ultimamente sono andate diradandosi, e alla mia tata Ale per le telefonate interminabili che hanno resistito ai tanti km di distanza; grazie a mia cognata Fra che mi accompagna per castagne e mi darà tanti nipotini (ora non puoi più tirarti indietro) e a sua sorella Laura, con la raccomandazione di non prendere la mia strada...e grazie al loro gatto-cane Ben, che mi ha fatto rivalutare la specie felina!

Grazie ai miei nuovi amici Alessandra e Darietto, perché finalmente ho qualcuno che capisce le mie paranoie!!!E un Pastore Tedesco da spupazzare...

Grazie ad Amedeo, che purtroppo per lui è capitato in un momento in cui sono insopportabile!!Quindi, grazie di starmi vicino..

Grazie a tutto lo "staff" dell'ambulatorio di Spezia, per aver avuto il coraggio di farmi fare le mie prime esperienze pratiche!!!

E ringrazio non per ultimo il "mio" Professor Vannozzi, per avermi insegnato ad aver fiducia in me stessa, e i miei tutori nonché balie Viola e Lorenzo, per le innumerevoli spiegazioni che mi hanno dato...!!!

E con loro grazie a tutti i miei compagni di facoltà...Chiara, Marta, Francesca, Gloria, Silvia, Valentina, Luca, Gianluca, Matteo...che mi hanno allietato quest'ultimo anno di università!!

Infine un bacio alla mia cucciola Asia, che mi distrugge sempre tutto e le voglio bene per questo.